

PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO

Propriedades Físico-Químicas de Soluções Formadoras e de
Filmes de Caseinato de Sódio Plastificados com Sorbitol.

Tese submetida ao Curso de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Professor Valdir Soldi

Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

Departamento de Química

Pós-Graduação em Química

Florianópolis, Maio de 2003

Título: Propriedades Físico-Químicas de Soluções Formadoras e de Filmes de Caseinato de Sódio Plastificados com Sorbitol.

PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO

Esta Tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da Banca Examinadora para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador

Prof. Dr. Faruk Nome
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral
Relator

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Prof. Dra. Evanilda Teixeira

Prof. Dra. Marina Uieara

Prof. Dr. Eduardo Antônio Pinheiro

SUMÁRIO

Sumário	3
Índice de Figuras	5
Índice de Tabelas	8
Lista de símbolos e abreviaturas	9
Agradecimentos	11
Dedicatória	12
Resumo	13
Abstract	14
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	15
1.1 Definição do Tema	15
1.2 Justificativas e Aplicações	17
1.3 Objetivos	19
1.3.1 Objetivos Gerais	19
1.3.2 Objetivos Específicos	19
1.4 Conceitos Básicos e Revisão Bibliográfica	21
1.4.1 Formação do filme	21
1.4.2 Proteínas	22
1.4.3 Proteínas do leite	24
1.4.4 Propriedades de proteínas em soluções aquosas e das soluções formadoras de filmes	28
1.4.5 Propriedades mecânicas	31
1.4.6 Transição vítrea	35
1.4.7 Propriedades de barreira a gases e vapor de água	37
CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL	40
2.1 Preparação das Amostras	40
2.2 Reologia das Soluções	40
2.3 Densidade das Soluções	40
2.4 Preparação dos Filmes	41

2.5 Propriedades Estruturais	41
2.6 Propriedades Mecânicas	41
2.7 Temperatura de Transição Vítrea	42
2.8 Permeabilidade ao Vapor de Água	43
2.9 Permeabilidade ao Oxigênio	43
2.10 Análise Térmica	44
2.11 Dicroísmo Circular	44
2.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	44
2.13 Espectroscopia de Infravermelho	45
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	46
3.2 Comportamento Reológico de Soluções de Caseinato de Sódio	47
3.3 Comportamento Reológico de Soluções de Caseinato de Sódio/Sorbitol	53
3.4 Determinação do Volume Específico Parcial do Caseinato de Sódio	56
3.5 Dicroísmo Circular	59
3.6 Isotermas de Desorção de Umidade	61
3.7 Caracterização da Temperatura de Transição Vítrea	68
3.8 Propriedades Mecânicas	72
3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura	81
3.10 Estabilidade Térmica dos Filmes de Caseinato de Sódio Plastificados com Sorbitol	85
3.11 Permeabilidade ao Oxigênio	94
3.12 Permeabilidade ao Vapor de Água	96
3.13 Aplicação dos Filmes de Caseinato de Sódio Plastificados com Sorbitol	98
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	102
Referências Bibliográficas	104

FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas	24
Figura 2 – Beta-lactoglobulina, estrutura primária, secundária (b) e terciária (a)	27
Figura 3 – Alfa-lactoalbumina, estrutura primária, secundária (b) e terciária (a)	27
Figura 4 – Representação esquemática do processo de dissolução de moléculas de polímero	30
Figura 5 – Gráfico tensão-deformação	32
Figura 6 – Gel de eletroforese SDS-PAGE de soluções de caseinato de sódio	47
Figura 7 – Reogramas de soluções de caseinato de sódio, a diversas concentrações, a 25°C	49
Figura 8 – Reogramas de solução de caseinato de sódio (13% p/p) a várias temperaturas	50
Figura 9 – Efeito da temperatura na viscosidade de soluções de caseinato de sódio, nas concentrações de 10,5; 11; 11,5; 12; 12,5 e 13% (p/p)	50
Figura 10 – Efeito da concentração na viscosidade de soluções de caseinato de sódio, segundo a lei das potências	52
Figura 11 – Viscosidade das soluções de caseinato de sódio em função da concentração e temperatura	53
Figura 12 – Reograma de solução de caseinato de sódio a 12% (p/p) com 20g de sorbitol/100g de solução	54
Figura 13 – Efeito do sorbitol na viscosidade de soluções de caseinato de sódio a 20°C	55
Figura 14 – Gráfico para determinação dos valores de volume específico parcial do caseinato de sódio	57
Figura 15 – Comportamento dos valores do volume específico parcial do caseinato de sódio frente ao aumento da molalidade de sorbitol na solução, a linha cheia assume uma dependência linear ($r = -0,9758$)	58

Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular no ultravioleta distante de soluções aquosas de caseinato de sódio (linha cheia – preta) e soluções de caseinato de sódio em água-sorbitol com 0,3 (linha tracejada – vermelha) e 0,8 (linha azul – pontilhada) g sorbitol/mL	61
Figura 17 – Isoterma de desorção de água de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol	63
Figura 18 – Gráfico do conteúdo de umidade no equilíbrio dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol após serem mantidos a diversas umidades relativas do ar	65
Figura 19 – Gráfico para obtenção dos parâmetros do modelo de Oswin	66
Figura 20 – Gráfico para obtenção dos parâmetros da equação de BET	66
Figura 21 – Curva de TMA para filme de caseinato de sódio	70
Figura 22 – Curvas de TMA para filmes de caseinato de sódio/sorbitol	71
Figura 23 – Comparação dos modelos de Fox e Gordon-Taylor aplicados aos filmes de caseinato de sódio/sorbitol, em função do conteúdo de sorbitol (w_1)	72
Figura 24 – Curvas típicas de tensão vs. deformação de filmes (a) CS/S (1/0,4) e (b) CS/S (1/0,5)	74
Figura 25 – Média dos valores do módulo de Young para os filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol e mantidos a diferentes umidades relativas do ar	75
Figura 26 – Tensão máxima dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol a diversas umidades relativas do ar	77
Figura 27 – Deformação na ruptura dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol e mantidos a diferentes atmosferas de umidade relativa do ar	79
Figura 28 – Micrografia utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) de (a) seção transversal e (b) superfície de filme de caseinato de sódio	82
Figura 29 – Micrografia de microscópio eletrônico de varredura (MEV) da seção transversal de filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (30% p/p)	83
Figura 30 – Micrografia de microscópio eletrônico de varredura da superfície de filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (30% p/p)	84

Figura 31 – Curvas termogravimétricas para filmes de caseinato de sódio com e sem a adição de plastificante (sorbitol) a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$	86
Figura 32 – Gráfico da energia de ativação vs. a fração de perda de massa para os filmes de caseinato de sódio com e sem a adição de plastificante (sorbitol)	88
Figura 33 – Espectro FTIR do resíduo sólido do filme de caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4)	91
Figura 34 – Espectro FTIR dos produtos gasosos da degradação térmica de filme de caseinato de sódio plastificados com sorbitol (1/0,4)	93
Figura 35 – Fotografias das frutas (bananas) recobertas ou não com filme de caseinato de sódio (1/0,4); (a) antes do recobrimento com o filme; (b) 72 horas após o recobrimento; (c) 120 horas após o recobrimento; (d) 192 horas após o recobrimento com o filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol	101

TABELAS

Tabela 1 – Concentração das principais proteínas do leite	26
Tabela 2 – Constantes do modelo de Arrhenius que relacionam o efeito da temperatura e viscosidade em soluções de caseinato de sódio	51
Tabela 3 – Constantes do modelo Lei da Potência para o efeito da concentração na viscosidade de soluções de caseinato de sódio	52
Tabela 4 – Parâmetros estimados para os modelos selecionados das equações de isoterma de sorção para filmes de caseinato de sódio plastificados com diferentes teores de sorbitol	67
Tabela 5 – Temperatura de transição vítrea (T_g) e o coeficiente de expansão térmica linear (α) de filmes de caseinato de sódio e caseinato de sódio/sorbitol	70
Tabela 6 – Propriedades mecânicas de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol	76
Tabela 7 – Comparação dos valores de módulo de Young de filmes de proteínas de diversos estudos publicados	77
Tabela 8 – Comparação de valores de tensão máxima e deformação na ruptura de vários filmes	80
Tabela 9 – Parâmetros termogravimétricos e cinéticos para filmes de caseinato de sódio com e sem adição de sorbitol	87
Tabela 10 – Energia de ativação aparente de vários polímeros sintéticos e naturais	90
Tabela 11 – Propriedades de barreira ao oxigênio de vários filmes biopoliméricos e sintéticos	95
Tabela 12 – Taxa de permeabilidade ao vapor de água a 23°C e 75% URE – método gravimétrico	96
Tabela 13 – Valores de permeabilidade ao vapor de água de diversos filmes biopoliméricos e sintéticos	98
Tabela 14 – Parâmetros bioquímicos de amadurecimento de banana-prata	99

Lista de Símbolos e Abreviaturas

E – energia de ativação

MEV – microscopia eletrônica de varredura

kDa – quilo Dalton

DMTA – análise dinâmica termo-mecânica

pH – potencial hidrogeniônico

T_g – temperatura de transição vítrea

DSC – calorimetria exploratória diferencial

ASTM – American Society for Testing and Materials

TMA – análise termo-mecânica

TGA – análise termo-gravimétrica

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

L₀ – comprimento original da amostra

α - coeficiente linear de expansão térmica

w₁ – fração em massa do plastificante

w₂ – fração em massa do polímero

k – constante da equação do Gordon-Taylor

TPVA – taxa de permeabilidade ao vapor de água

URE – umidade relativa do ar

[θ] – elipticidade molar

ΔAbs – diferença na absorbância

l – caminho ótico

SDS – dodecil sulfato de sódio

EDTA – ácido etilenodimano tetracético

DTT – ditionitrito

KBr – brometo de potássio

SiO₂ – óxido de silício

τ - tensão de cisalhamento

γ - taxa de cisalhamento

η - viscosidade

Pa – pascal
R – constante universal dos gases
 η_1 – fator pré-exponencial
A₁ – expoente da Lei das Potências
C – concentração em %
m₂ – massa do polímero
v₂ – volume específico parcial
V₁ – volume molar parcial do solvente
a_w – atividade de água
BET – Brunauer-Emmet-Tellet
m₁ – conteúdo de água na monocamada
c – constante da equação de BET
k e b – constantes da equação de Oswin
CS/S – caseinato de sódio/sorbitol
MPa – mega Pascal
LDPE – polietileno de baixa densidade
HDPE – polietileno de alta densidade
PP – polipropileno
PET – polietileno teraftalato
EVOH – etilenovinilalcool
HPMC – hidroxipropilmetilcelulose
MC – metilcelulose
HPC - hidroxipropilcelulose

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, por acreditar no trabalho deste seu início, pela orientação, dedicação, amizade e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Alfredo Tibúrcio Nunes Pires pela amizade, críticas e valiosas sugestões durante a realização desse trabalho.

À Marly Silveira Soldi pela constante presença e amizade.

Aos Professores Bertolino e Pinheiro pela grande colaboração.

À empresa New Zeland Milk Prodnuts pela cessão das amostras de caseinato de sódio, material essencial para a realização desse trabalho.

Aos colegas Elcio, Marcos, Janaína, Ricardo, Jerusa, Márcia, Patrícia, Luiz pelas discussões durante o andamento do trabalho e pela amizade que fica.

Dedicatória

Dedico este trabalho as duas pessoas mais importantes da minha vida e razão principal da realização deste: Fernanda e Rafael. Agradeço pela compreensão de tantos momentos ausentes e pelo compartilhamento de minhas angústias, dúvidas, discernimentos, certezas e alegrias. Obrigado por acreditarem em mim.

RESUMO

As propriedades reológicas de soluções formadoras de filmes de caseinato de sódio foram estudadas em termos de concentração, temperatura e conteúdo de plastificante. Os gráficos de tensão de cisalhamento *vs.* taxa de cisalhamento mostraram um comportamento tipicamente newtoniano em todos os sistemas estudados. O efeito da temperatura na viscosidade foi descrito pela equação de Arrhenius, enquanto o efeito da concentração foi descrito pela equação da Lei das Potências. A viscosidade aumentou com a concentração de proteína. A presença do plastificante nas soluções formadoras de filmes de caseinato de sódio diminuiu a viscosidade e o volume específico parcial devido a uma desidratação da proteína e também induziu uma maior ordenação estrutural, como observado pela espectroscopia de dicroísmo circular. A presença de plastificante diminuiu a temperatura de transição vítrea, para os filmes de caseinato de sódio, e também diminuiu o módulo de Young, tensão máxima e aumentou a deformação na ruptura. A presença de sorbitol não afetou a morfologia dos filmes, monitorada por microscopia eletrônica de varredura. A degradação térmica dos filmes de caseinato de sódio foi estudada por termogravimetria e espectroscopia de infravermelho em atmosfera de nitrogênio. Filmes de caseinato de sódio mostraram as mais altas temperaturas de degradação máxima, enquanto o aumento do conteúdo de sorbitol nos filmes diminuiu a temperatura de degradação máxima. Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier mostraram que a degradação efetiva iniciou por volta de 300°C com a formação de produtos gasosos como CO₂ e NH₃, sugerindo que o mecanismo de reação inclui, ao mesmo tempo, a cisão de ligações C-N, C(O)-NH, C(O)-NH₂, -NH₂ e C(O)-OH da cadeia protéica. As isothermas de sorção de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol mostraram um formato sigmoidal com concavidade para cima. O modelo de BET mostrou que os filmes com maior teor de plastificante apresentaram um maior conteúdo de água na monocamada de hidratação. As curvas de sorção dos filmes de caseinato de sódio foram curvas típicas para polímeros sensíveis à água. As taxas de permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água de filmes de caseinato de sódio/sorbitol foram comparadas com outros filmes de proteínas e materiais sintéticos.

ABSTRACT

The rheological properties of sodium caseinate film-forming solutions were studied in terms of concentration, temperature and plasticizer content. The shear stress-shear rate plot showed typical Newtonian behaviour in all of the studied systems. The effect of temperature on the viscosity was described by Arrhenius equation, while the effect of concentration was described by Power Law equation. The viscosity increased with protein concentration. The presence of plasticizer in the sodium caseinate film-forming solutions decreased the viscosity and partial specific volume due to the protein dehydration and also induced a more ordered structure, as observed by circular dichroism spectroscopy. The presence of plasticizer decreased the glass transition temperature, for solid films of sodium caseinate, and also decreased the Young modulus, tensile strength and increased the deformation at rupture. The presence of sorbitol did not affect the morphology of the films, monitored by scanning electronic microscopy. The thermal degradation of sodium caseinate films was studied by thermogravimetry and infrared spectroscopy in nitrogen atmosphere. Sodium caseinate films showed the highest maximum degradation temperature, while the increased in sorbitol content decreased the maximum degradation temperature. The FTIR spectra showed that the effective degradation began at ca. 300°C with the formation of gas products such as CO₂ and NH₃, suggesting that the reaction mechanism included at the same time the scission of the C-N, C(O)-NH, C(O)-NH₂, -NH₂ and C(O)-OH bonds of the protein. The sorption isotherms of sodium caseinate films plasticized with sorbitol showed a sigmoidal shape with upper concavity. The BET model showed that the films with highest content of plasticizer has a higher content of water at monolayer. The sorption curves of sodium caseinate films were typical of water vapour sensitive polymers. The oxygen and water vapour permeability of sodium caseinate-sorbitol films compared favorably with those of other protein and synthetic film materials.

INTRODUÇÃO

1.1 Definição do tema

A manutenção de qualidades organolépticas, higiênicas e nutricionais de alimentos é controlada por um conjunto de fatores que incluem as características do produto, propriedades físico-químicas, população microbiana e condições de armazenamento. Alterações físico-químicas e bioquímicas que ocorrem nos alimentos durante o armazenamento ou estocagem são principalmente devidas à migração de solutos, água e gases entre os constituintes dos alimentos ou entre os alimentos e o meio que o circunda.

Para prevenir tais alterações e prover proteção contra agentes externos a pesquisa e desenvolvimento de novos materiais, como por exemplo, filmes biodegradáveis e comestíveis para uso como embalagens, tem aumentado de forma significativa nas últimas décadas. As principais características destes filmes incluem a natureza renovável da fonte de seus ingredientes (biopolímeros), a habilidade destes filmes em funcionar como suportes de aditivos alimentares (antioxidantes, flavorizantes, conservantes) e o uso potencial destes em sistemas alimentares heterogêneos ou homogêneos como barreira ao transporte de vapores, gases e solutos.

A composição da embalagem biodegradável e comestível é uma escolha em função das propriedades desejadas e do biopolímero selecionado. Proteínas (glúten de trigo, zeína do milho, proteína de soja, colágeno, ovalbumina, proteínas do soro do leite, caseína, caseinatos e proteínas miofibrilares de peixe ou carne) e polissacarídeos (derivados hidrossolúveis de celulose, amido, pectina, alginatos, carragena, dextrinas e outras gomas) resultam em filmes com boas propriedades mecânicas e organolépticas e são barreiras efetivas a compostos de aroma e gases de baixa massa molar como oxigênio e dióxido de carbono. Filmes derivados de lipídeos são principalmente usados para reduzir a transferência de vapor de água, sendo que os mais eficientes são os derivados de ceras, que por sua vez possuem características sensoriais indesejáveis ¹.

Filmes produzidos a partir de polissacarídeos e proteínas são esperados como sendo excelentes barreiras ao oxigênio devido ao empacotamento das moléculas formando uma

rede estrutural ordenada através de ligações de hidrogênio. No entanto comparado aos filmes sintéticos, a maior limitação no uso como embalagem de alimentos é a sua solubilidade em água e a alta permeabilidade ao vapor de água, devido a sua hidrofilicidade².

O uso de proteínas do leite, como matéria prima destes filmes pode, além de elevar o valor nutricional dos alimentos acondicionados, aumentar o potencial de utilização de derivados lácteos.

A caseína é a principal proteína do leite bovino e está presente na proporção de 24-28 g / L e é formada por quatro frações principais: α_{s1} - (38%), α_{s2} - (10%), β - (36%) e κ -caseína (13%). As diferenças estão associadas a variação na massa molar (19.000 – 23.900 g/mol) e hidrofobicidade. O caseinato de sódio, que é obtido pela solubilização da caseína precipitada em meio ácido por hidróxido de sódio, apresenta como característica principal a total solubilidade em água³.

Nos filmes preparados à base de proteínas são geralmente incorporados plastificantes que tem como função principal diminuir a interação proteína-proteína e assim, evitar que estes se tornem quebradiços. De acordo com Ferry⁴, a incorporação de plastificantes tende a aumentar a extensibilidade ou flexibilidade de polímeros. A ação plastificante, em nível molecular, leva ao aumento do espaço intermolecular ou volume livre, diminui a viscosidade local e, conseqüentemente, aumenta a mobilidade. O efeito plastificante parece estar relacionado com a compatibilidade polímero-plastificante, massa molar e temperatura de transição vítrea (T_g). A compatibilidade é necessária e é favorecida pelo decréscimo na massa molar do plastificante e pelo aumento de interações intermoleculares.

A temperatura de transição vítrea (T_g) é um parâmetro determinante para o entendimento das propriedades mecânicas de polímeros e é exibida por polímeros amorfos ou pela porção amorfa de polímeros semicristalinos quando um estado viscoso (elastomérico) é transformado em um estado vítreo. A importância de sua determinação, deve-se ao fato de que esse parâmetro físico-químico pode determinar a processabilidade, qualidade, estabilidade e aplicabilidade do polímero⁵.

A proteção e a preservação são desempenhos básicos que uma embalagem deve fornecer a um produto, seja ele um alimento ou não. A proteção mecânica deve ser

fornecida por uma embalagem durante a manipulação ou trânsito e com a prevenção de contaminação por poeira, microorganismos ou substâncias estranhas as quais podem afetar o produto. Por outro lado, uma função vital das embalagens é a de manter ou estender a vida de prateleira de um produto alimentar pelo controle da atmosfera dentro da embalagem em termos do balanço de gás ou vapor de água.

Assim necessidades funcionais primárias para que um determinado produto possa servir como embalagem é prover proteção e preservação, as quais são diretamente dependentes das propriedades físico-químicas dos filmes.

1.2 JUSTIFICATIVAS E APLICAÇÕES

Diversos são as aplicações e formulações de biofilmes e coberturas comestíveis em alimentos e o seu uso possui um potencial ainda não explorado. Quando da seleção de uma determinada embalagem comestível é muito importante o conhecimento das características do produto alimentar a ser aplicada. Reações deteriorativas em alimentos incluem alterações enzimáticas, químicas, físicas e microbiológicas. Problemas adicionais incluem ainda, insetos, pestes e roedores.

Em um contexto de embalagens as alterações enzimáticas em alimentos são determinadas pela temperatura, atividade de água e alterações no substrato (por exemplo, disponibilidade de oxigênio em reações oxigênio-dependentes catalisadas por enzimas).

Alterações químicas deteriorativas em alimentos incluem o escurecimento não enzimático, hidrólise de lipídeos, oxidação de lipídeos, desnaturação de proteínas, entrecruzamento de proteínas, hidrólise de proteínas e oligo ou polissacarídeos, síntese de polissacarídeos, degradação de pigmentos naturais e alterações glicolíticas. Estas reações na maior parte do tempo ocorrem simultaneamente nos alimentos e seus produtos e reagentes interagem entre si. O grau destas reações químicas depende de inúmeros parâmetros, os quais podem ser controlados pela escolha certa da embalagem. Isto inclui a transparência a luz (intensidade e comprimento de onda), pressão parcial dos gases (oxigênio e dióxido de carbono), atividade de água e temperatura³.

As propriedades físicas dos alimentos podem ser definidas como aquelas que podem ser descritas e quantificadas por meios físicos, como por exemplo, a perda de solubilidade, perda na capacidade de retenção de água, intumescimento e capacidade de difusão de gases

e vapor de água. O controle da sorção de água (propriedade de barreira) é uma das mais importantes características em uma embalagem de modo a prevenir alterações físicas em um alimento.

A flora original do alimento, pH do produto, atividade de água do alimento, composição em nutrientes (minerais, açúcares e vitaminas), temperatura de estocagem, estrutura física do produto, concentração de gases no interior da embalagem e a população de microorganismos na embalagem são fatores primordiais para o desenvolvimento de fungos e bactérias em um alimento embalado.

Filmes comestíveis e/ou biodegradáveis são produzidos a partir de polímeros de origem biológica (biopolímeros) capaz de formar uma matriz contínua e coesa, e a aplicação destes filmes como embalagem ou cobertura, seja em alimentos ou qualquer outro produto, depende do conhecimento e da caracterização das propriedades físico-químicas dos filmes. Há evidências na literatura de que as proteínas são materiais promissores e ainda pouco conhecidos, em virtude de suas propriedades funcionais, como ingredientes básicos na formulação de filmes.

Desde que a funcionalidade de filmes de biopolímeros é geralmente afetada pela estrutura do polímero, composição do filme, plastificantes utilizados e umidade relativa do ambiente⁶, a investigação de propriedades relacionadas com o comportamento e característica da molécula protéica em solução é fundamental. Aspectos como a interação polímero-plastificante, características físico-químicas do filme, propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água, CO₂ e O₂, conhecimento de propriedades térmicas, termomecânicas, de sorção e difusão de vapor de água e gases são de grande interesse, já que estas propriedades determinarão o comportamento do material durante o processamento, manipulação, armazenamento e consumo.

O uso de filmes tendo como base polímeros de origem biológica, portanto oriundos de fontes de recursos renováveis, poderá diminuir a pressão sobre o meio ambiente, com a diminuição do uso de materiais oriundos de fontes não renováveis (petróleo), diminuição de taxas de poluição e volume de material descartado.

As técnicas que foram empregadas para o estudo das propriedades das soluções formadoras de filmes e dos filmes de caseinato de sódio com ou sem adição de plastificante

(sorbitol) podem fornecer valiosas informações ao entendimento das características dos filmes e suas possíveis aplicações.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo a preparação de biofilmes a partir de polímeros de origem biológica (proteínas). Especial atenção será dada às propriedades físico-químicas de soluções formadoras de filmes e a filmes de caseinato de sódio e de caseinato de sódio plastificados com sorbitol.

O caseinato de sódio foi escolhido devido suas propriedades funcionais (solubilidade em água, capacidade emulsificante, capacidade de formar filmes) e disponibilidade no mercado a preços razoáveis (US\$ 9,66/kg).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o comportamento e as propriedades reológicas de soluções de caseinato de sódio e de caseinato de sódio/plastificante, a várias concentrações e temperaturas;
- Caracterizar através da eletroforese em gel de poliacrilamida as frações protéicas, presentes no caseinato de sódio e a correspondente massa molar;
- Determinar a energia de ativação (E_a) de fluxo para as soluções de caseinato de sódio;
- Avaliar o efeito do plastificante nas propriedades hidrodinâmicas (volume específico parcial e viscosidade intrínseca) da molécula de caseinato de sódio em solução aquosa e em solução na presença de plastificante;
- Avaliar o efeito do plastificante em possíveis alterações na estrutura conformacional da molécula de caseinato de sódio;
- Avaliar para os filmes de caseinato de sódio e caseinato de sódio/plastificante:

- a temperatura de transição vítrea do caseinato de sódio;
- as propriedades mecânicas (tensão de ruptura, deformação na ruptura, tensão máxima e módulo de elasticidade) em diferentes atmosferas de umidade relativa do ar;
- a estrutura morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- a estabilidade térmica;
- a energia de ativação (E) de degradação térmica;
- a permeabilidade ao vapor de água e oxigênio (O_2);
- o comportamento em frutos como a banana após a aplicação de filmes de caseinato e determinação de indicadores bioquímicos do amadurecimento do fruto (pH, açúcares não-redutores, açúcares redutores e teor de amido).

1.4 Conceitos Básicos e Revisão Bibliográfica

1.4.1 Formação de Filmes

A formulação de um filme está associada a presença de três componentes principais: um polímero de alta massa molar, um plastificante e um solvente⁷. Um requisito básico para o plastificante é que seja miscível com o polímero e ambos devem possuir solubilidade semelhante no solvente.

De acordo com Banker⁶, um plastificante é uma substância não volátil, com um ponto de ebulição alto, miscível e que quando adicionado a outro material altera suas propriedades físicas e/ou mecânicas. McHugh e Krochta⁸ afirmam que polióis como sorbitol, glicerol, polietilenoglicol são plastificantes efetivos devido a suas habilidade em reduzir as ligações de hidrogênio internas ao mesmo tempo em que aumentam os espaços intermoleculares.

Quanto aos polímeros que podem ser utilizados para a produção de biofilmes, Kester e Fennema⁹ utilizaram uma classificação geral baseada na natureza do material usado para sua produção. Os autores classificaram os filmes como à base de proteínas, polissacarídeos, lipídeos e compósitos (produzidos pela mistura de alguns componentes antes mencionados). De acordo com Debeaufort e colaboradores¹⁰ a formulação de um filme deve possuir no mínimo um componente capaz de formar uma matriz estrutural com suficiente coesividade.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a formação de filmes¹¹. Geralmente é preparada uma solução e a formação do filmes se dá pela remoção do solvente. Podendo a solução ser aplicada diretamente sobre o material a ser recoberto pelo filme ou ser utilizado um suporte, para posterior utilização do filme. Gennadios e Weller¹² afirmaram que não existe uma distinção clara entre filmes e coberturas e que estes dois termos são geralmente intercambiáveis. No entanto, usualmente as coberturas são aplicadas e formadas diretamente na superfície do produto, enquanto os filmes são formados separadamente como folhas finas e então aplicados aos produtos.

Dentre os biopolímeros citados na literatura como capazes de formarem filmes encontra-se: proteínas do soro do leite, gelatina, caseína, caseinatos, zeína do milho, proteína isolada de soja, proteínas da clara do ovo, polissacarídeos como os derivados

hidrossolúveis de celulose (metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose), amidos, goma gelana, goma xantana, pectina, e lipídeos como cera de abelha e outros^{09, 10, 11, 12}.

1.4.2 Proteínas

Todas as transformações moleculares que definem o metabolismo celular são mediadas, praticamente, pela catálise protéica. As proteínas exercem também funções regulatórias, controlando as condições intracelulares e extracelulares e mandando informações para outros componentes da célula. Além disso, as proteínas são componentes estruturais essenciais das células. Uma lista completa de funções conhecidas das proteínas teria milhares de itens, incluindo proteínas que transportam outras moléculas e proteínas que geram forças mecânicas e eletroquímicas. Mesmo assim ainda haveria milhares cujas funções ainda não estão inteiramente elucidadas ou, em muitos casos, são mesmo completamente desconhecidas¹³.

Assim como outras importantes macromoléculas de origem biológicas, os ácidos nucléicos e os polissacarídeos, as proteínas são polímeros formados por moléculas menores. Porém, ao contrário dos ácidos nucléicos, as proteínas não apresentam estruturas regulares e uniformes. Isso se deve, em parte, ao fato de que os vinte aminoácidos que formam as proteínas apresentam propriedades físicas e químicas muito distintas. O modo como esses aminoácidos estão ordenados é que determinará as propriedades físicas e químicas das proteínas.

Uma classificação em termos de níveis de organização descreve as proteínas como possuindo estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária de uma proteína consiste na seqüência de aminoácidos da sua cadeia polipeptídica ou das suas cadeias polipeptídicas, no caso de esta ser constituída de mais de uma cadeia. Cada resíduo de aminoácido está ligado ao próximo por uma ligação peptídica.

A análise de um grande número de proteínas mostrou que estas são compostas de 20 aminoácidos-padrão, que estão presentes na maioria das proteínas. Os aminoácidos comuns são conhecidos como α -aminoácidos porque possuem um grupo amino primário ($-\text{NH}_2$) e um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) como substituintes do mesmo átomo de carbono (alfa). A única exceção é a prolina, que possui um grupo amino secundário ($-\text{NH}-$). Cada um dos 20 aminoácidos-padrão difere nas estruturas de suas cadeias laterais e conseqüentemente nas

suas propriedades físicas e químicas. De uma forma simples, os aminoácidos são classificados em hidrofóbicos, polares carregados e não-carregados¹⁴.

A estrutura secundária é o arranjo espacial dos átomos de um esqueleto polipeptídico, sem levar em consideração a conformação de suas cadeias laterais. Inclui os padrões regulares de dobramento de polipeptídeos, como as hélices, as folhas pregueadas e as voltas. Na alfa-hélice, as pontes de hidrogênio da cadeia principal estão arranjadas de forma que a ligação peptídica C=O do n -ésimo resíduo aponta, ao longo do eixo da hélice, na direção do grupo peptídico N-H do resíduo $(n + 4)$. Cadeias laterais de aminoácidos projetam-se para fora e para baixo da hélice, evitando, portanto, a interferência estérica com o esqueleto polipeptídico e entre si. A parte central da hélice é altamente aglutinada, isto é, seus átomos estão em contato por ligações de van der Waals¹³.

Da mesma forma que a alfa-hélice, a folha beta utiliza todas as pontes de hidrogênio do esqueleto polipeptídico. Entretanto na folha β , as pontes de hidrogênio ocorrem entre cadeias polipeptídicas vizinhas e não no interior da cadeia, como na alfa-hélice. As proteínas podem ainda apresentar estruturas não repetitivas ou aleatórias (coil), sendo simplesmente irregulares e, portanto, mais difíceis de serem descritas¹⁴.

A estrutura terciária de uma proteína descreve o dobramento dos elementos estruturais secundários e especifica as posições de cada átomo na proteína, incluindo as das cadeias laterais.

A maioria das proteínas, particularmente aquelas com massas moleculares acima de 100 kDa, são constituídas por mais de uma cadeia polipeptídica. Essas subunidades polipeptídicas associam-se com uma geometria específica. O arranjo espacial dessas subunidades é conhecido como estrutura quaternária de proteína. A Figura 1 apresenta uma representação gráfica das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas¹⁴.

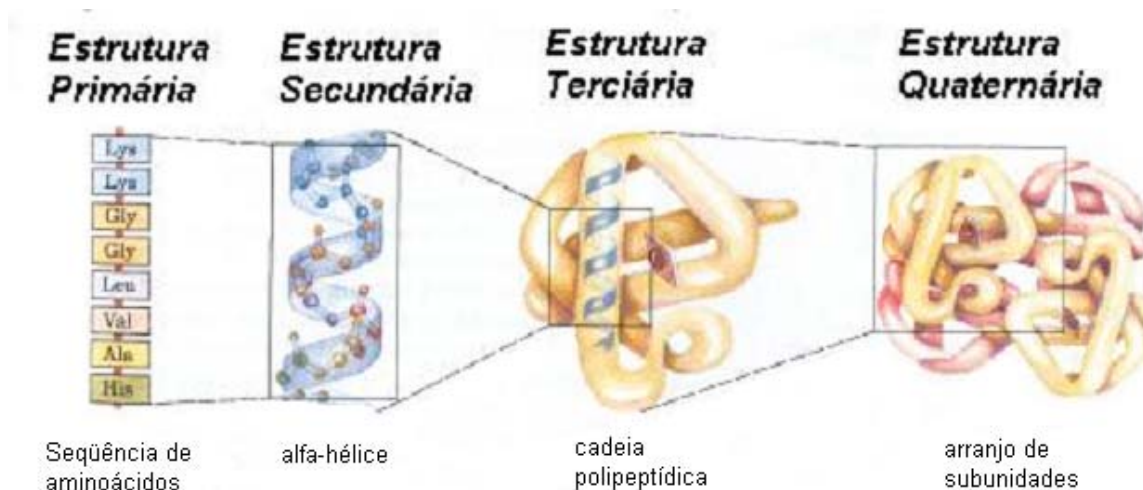


Figura 1 – Representação gráfica das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.

Fonte: [15]

Em relação às forças que estabilizam a estrutura das proteínas estas são regidas principalmente por efeitos hidrofóbicos e, em menor grau, por interações entre os resíduos polares e outros tipos de ligações, como as pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína.. O efeito hidrofóbico, que faz com que substâncias apolares minimizem seus contatos com a água, é o principal determinante da estrutura de proteínas nativas. A agregação de cadeias laterais apolares no interior de uma proteína é favorecida pelo aumento na entropia das moléculas de água que, de outra forma, iriam formar “gaiolas” ordenadas em torno dos grupos hidrofóbicos¹³.

1.4.3 Proteínas do Leite

De acordo com Belitz³ as proteínas do leite classificam-se como caseínas (α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína) e proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). A Tabela 1 apresenta a composição protéica do leite. As caseínas constituem cerca de 80% das proteínas do leite. Uma característica única das caseínas é seu alto conteúdo de resíduos de serina fosfatados e seu moderadamente alto conteúdo em resíduos de prolina e são bastante pobres em resíduos de cisteína.

A caseína e suas frações não têm sido extensivamente investigadas como quanto outros componentes protéicos na formação de filmes. Em função do baixo teor do aminoácido cisteína na cadeia protéica do caseinato (0,3% resíduo/mol de proteína), o que acarreta a baixa presença de ligações dissulfeto intermoleculares e devido ao alto teor de resíduos de prolina (10,9 % resíduo/mol de proteína), o que confere uma configuração ao acaso da cadeia protéica, portanto com baixos teores de alfa-hélice ou estruturas beta, o caseinato forma filmes a partir de soluções filmogênicas, sem a necessidade de tratamento térmico³.

A presença extensiva de ligações de hidrogênio entre grupos -OH, -NH, -COOH e -CO de resíduos de aminoácidos polares não-carregados, interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos não-polares e interações eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos polares carregados positiva e negativamente, são responsáveis pela formação de um filme coeso, sem a necessidade de tratamento térmico³.

Outra proteína que apresenta características semelhantes ao caseinato, ou seja, com ausência de ordem interna e configuração ao acaso da cadeia polipeptídica em solução, é a gelatina¹¹. A gelatina possuiu um histórico de aplicação na indústria farmacêutica como cobertura de comprimidos ou cápsulas. Presumivelmente, a temperaturas maiores que 35°C, a gelatina existe como uma simples molécula em uma configuração que não pode formar ligações de hidrogênio. No entanto, a baixas temperaturas, a gelatina assume uma configuração em hélice (similar ao colágeno) capaz de formar ligações de hidrogênio intercadeias³.

Diferentemente das características da caseína e da gelatina, uma outra fração protéica do leite, as proteínas do soro (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), possuem uma relativa ordem interna, tendo inclusive suas estruturas cristalográficas determinadas como mostrado nas Figuras 2 e 3.

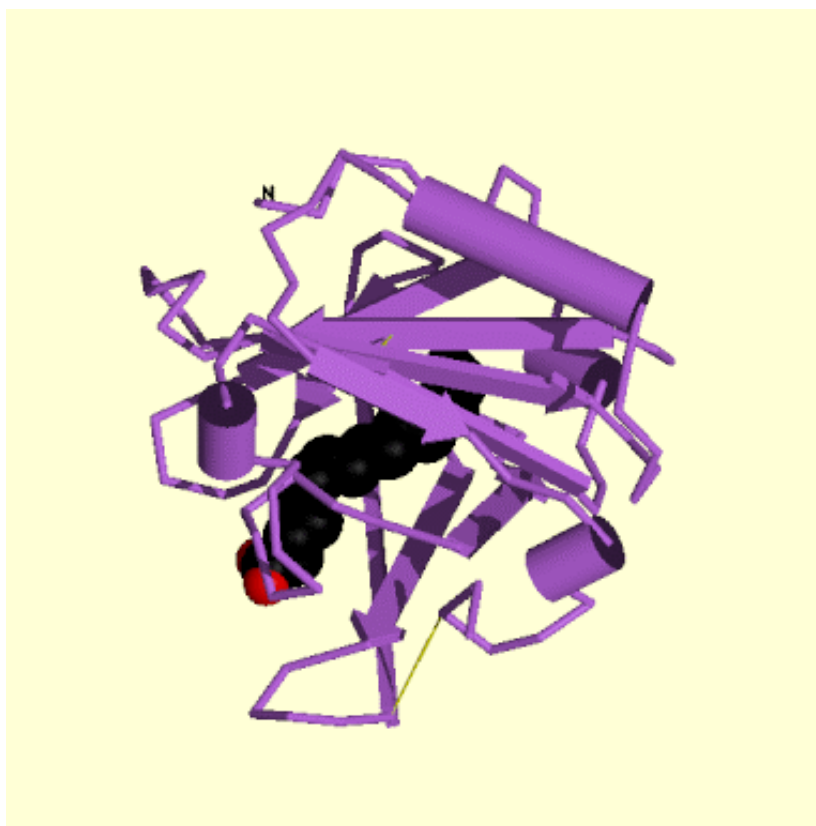
A β -lactoglobulina com a desnaturação pelo calor, sofre grande transformação conformacional com exposição de grupos nucleofílicos (-SH e ϵ -NH⁺³) altamente reativos e de áreas hidrofóbicas¹⁶. Por sua vez a α -lactoalbumina, possui uma massa molar (14.176 g/mol) um pouco menor do que β -lactoglobulina (\pm 18.000) e apresenta três pontes dissulfeto intramolecular¹⁶.

Tabela 1 – Concentração das principais proteínas do leite.

Proteína	Concentração (g/L)	Porcentagem aproximada do total
α_{s1} -caseína	12-15	34
α_{s2} -caseína	3-4	8
β -caseína	9-11	25
κ -caseína	3-4	9
γ -caseína	1-2	4
β -lactoglobulina	2-4	9
α -lactoalbumina	1-1,5	4
Proteases-Peptonas	0,6-1,8	4
Albumina sérica	0,1-0,4	1
Imunoglobulinas	0,6-1,0	2
Total		100

Fonte: ³

Ao contrário dos filmes produzidos com caseína, os produzidos a partir de proteínas do soro do leite são insolúveis em água, devido à presença de ligações cruzadas covalentes dissulfeto¹⁷. O fator limitante das proteínas do soro na preparação de filmes é seu alto custo, devido à complexa natureza dos processos de purificação de suas frações¹⁸.



(a)

(b)

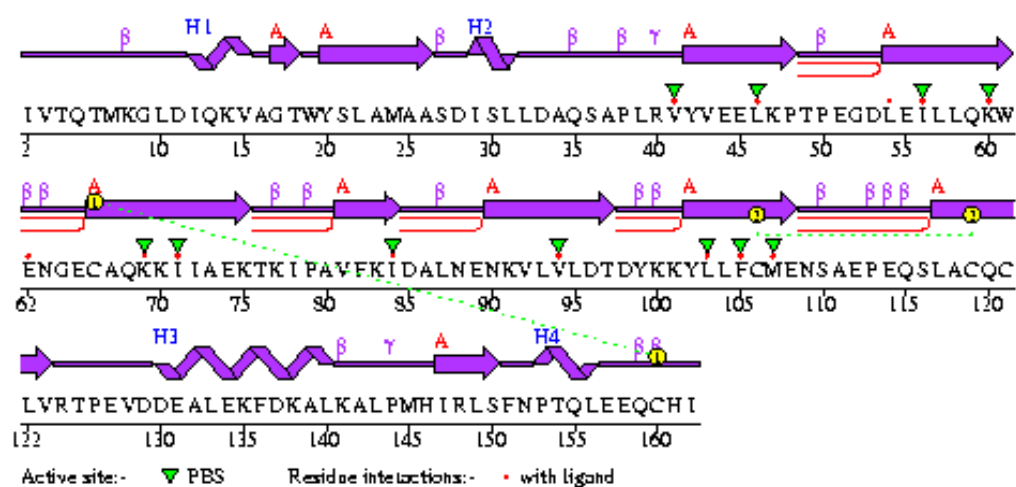
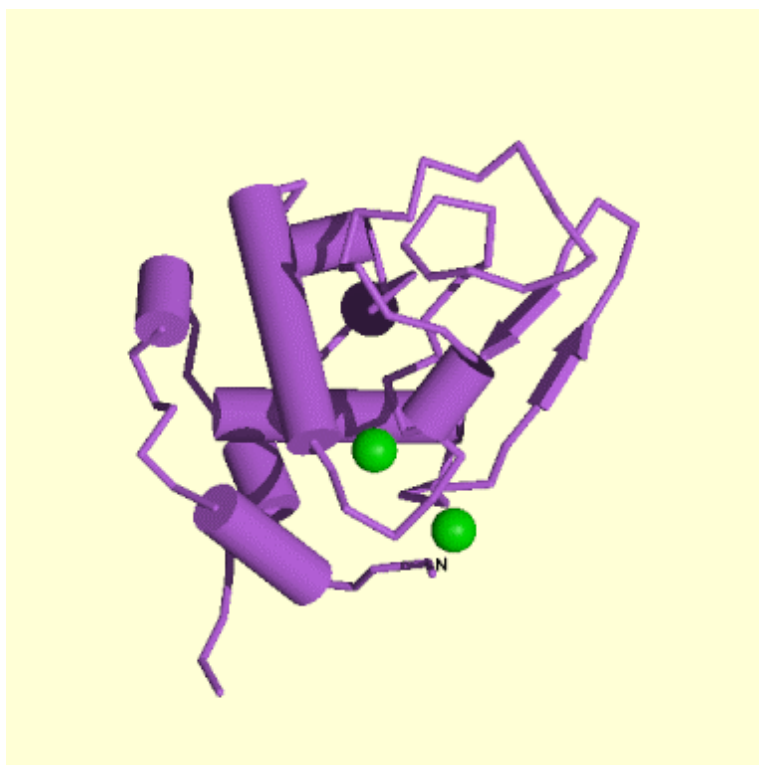


Figura 2 – Beta-lactoglobulina, estrutura primária, secundária (b) e terciária(a).



(a)

(b)

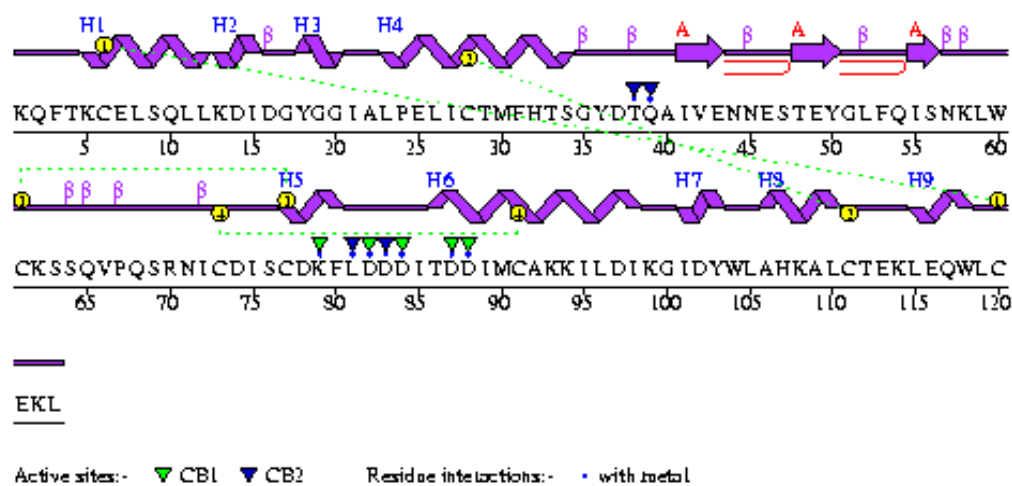


Figura 3 – alfa-lactoglobulina, estrutura primária, secundária (b) e terciária (a).

1.4.4 Propriedades de proteínas em soluções aquosas e das soluções formadoras de filmes.

A dissolução de um polímero é, geralmente, um processo lento, dependendo da estrutura e da massa molar do polímero. As moléculas de polímeros são constituídas de

cadeias longas com um grande número de segmentos (no caso das proteínas, os aminoácidos), que no estado sólido formam um emaranhado de espirais aleatórias mantidas unidas por uma série de forças atrativas tais como: ligações de hidrogênio, indução, interações dipolo-dipolo e forças de van der Waals.

De acordo com Tager¹⁹, devido às características das moléculas poliméricas, isto é, sua massa molar, configuração espacial e as forças de atração entre elas é que as moléculas de polímeros dissolvem-se mais lentamente do que moléculas de massa molar menor. Ainda segundo o autor, o processo de dissolução de um polímero em solução ocorre em dois estágios: no primeiro ocorre um intumescimento e o segundo seria a dissolução propriamente dita, conforme a representação gráfica da Figura 4.

O que pode ser notado na representação gráfica da Figura 4 é que uma vez estando todos os segmentos da cadeia dispersos na fase do solvente, eles ainda mantêm a sua conformação original, com as moléculas de solvente ocupando os espaços vazios entre os segmentos. Portanto, as cadeias poliméricas com as moléculas de solvente podem adotar uma configuração esférica ou elipsóide, ocupando um volume conhecido como volume hidrodinâmico da molécula polimérica.

O comportamento em solução das macromoléculas biológicas é determinado principalmente por três fatores: elas são muito grandes, podem interagir intensamente com ao solvente ou entre si, e freqüentemente são portadoras de cargas elétricas²⁰. Além disso, as macromoléculas podem exibir configurações em soluções, tais como: espirais aleatórias, tipo bastão ou macromoléculas globulares.

Este comportamento particular das moléculas poliméricas explica a alta viscosidade de soluções poliméricas, devido ao fato de que no processo de dissolução as moléculas tornam-se intumescida, restringindo sua mobilidade na solução, aumentando, conseqüentemente, a fricção intermolecular, tornando a solução muito mais viscosa.

De acordo com Tung²¹ as propriedades de fluxo de dispersões protéicas são governadas pela composição, assim como pela estrutura conformacional, massa molar e carga, os quais são influenciados pelas condições ambientais como temperatura, concentração, pH, força iônica do meio e histórico ou tratamento prévio.

Algumas publicações têm reportado o comportamento reológico de soluções de caseína e diversos sais de caseinato (sódio, cálcio, manganês), bem como a formação de filmes desta fração de proteínas do leite^{21, 22, 23, 24, 25, 26}.

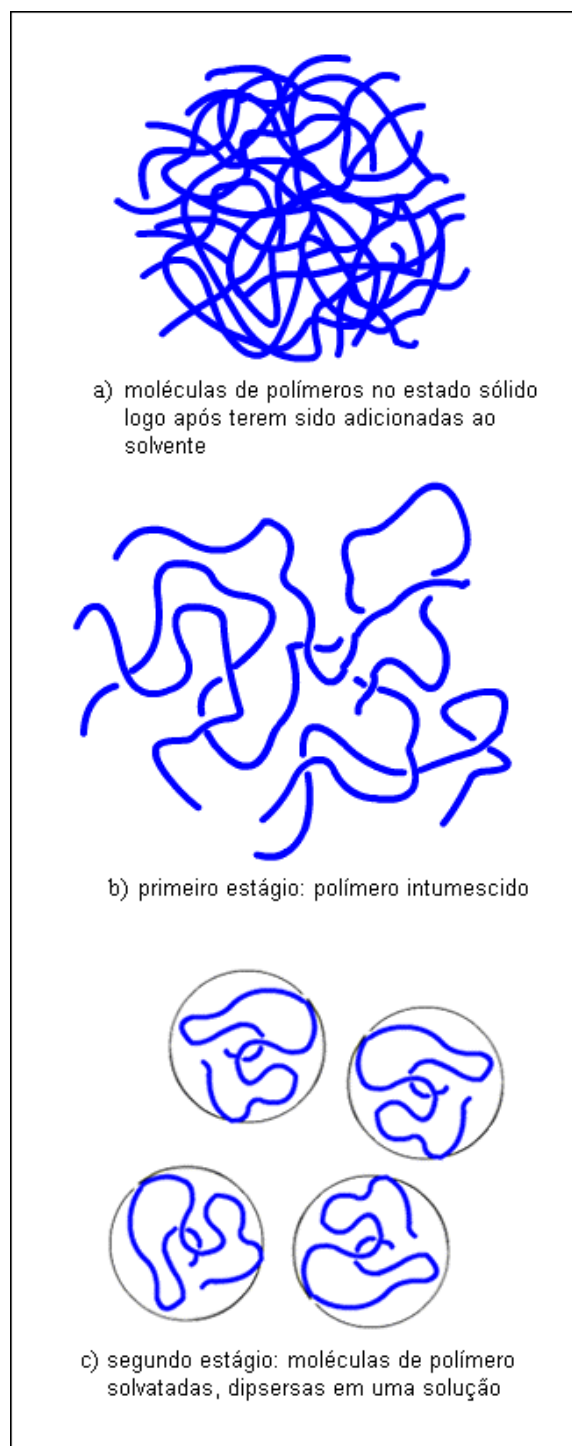


Figura 4 – Representação esquemática do processo de dissolução de moléculas de um polímero.

Arvanitoyannis e colaboradores²⁴ estudaram propriedades físicas de filmes comestíveis de misturas de caseinato de sódio com amidos de diferentes origens (milho e trigo) plastificados com água, glicerol ou açúcares. Os resultados apontaram que um aumento no conteúdo de água/glicerol provocou uma diminuição considerável no módulo de elasticidade e na tensão máxima dos filmes. Aparentemente o efeito plastificante, segundo os autores, pode ser devido a alterações na estrutura da rede polimérica, relacionadas à criação de regiões mais móveis, pelo abaixamento da temperatura de transição vítrea, monitorada por análise dinâmica termo-mecânica (DMTA).

1.4.5 Propriedades Mecânicas

De acordo com Ward e Hadley²⁷ o conhecimento das propriedades mecânicas de materiais poliméricos é de fundamental importância já que destas dependem muitas das aplicações industriais. As propriedades mecânicas são aquelas que determinam a resposta destes materiais às influências mecânicas externas. Estão associadas a capacidade de desenvolver deformações reversíveis e irreversíveis e de apresentar resistência a ruptura e/ou fratura. Ainda, de acordo com os autores, as propriedades mecânicas são uma consequência da composição da matriz polimérica e de sua estrutura nos níveis moleculares e supramoleculares.

As características mecânicas devem ser suficientes para manter a integridade através das práticas de produção e manipulação porque qualquer dano ao filme, como perfurações e rasgos, destrói as propriedades de barreira e proteção. A quantificação de dados para as características mecânicas dos filmes é essencial para o dimensionamento e desenho dos processos de embalagem e para que se alcance características desejáveis de aplicação específica²⁸.

Outra importante propriedade dos filmes poliméricos é sua resposta a aplicação de uma força, indicada por dois tipos principais de comportamentos: elástico e plástico. Materiais elásticos irão retornar à sua forma original desde que a força seja removida. Materiais plásticos não retomam sua forma. Em materiais plásticos, o fluxo ocorre semelhante a um líquido altamente viscoso. A maioria dos filmes poliméricos sintéticos demonstra uma combinação dos comportamentos elástico e plástico, apresentando comportamento plástico após o limite elástico ter sido excedido. A Figura 5 exemplifica o comportamento de um material viscoelástico sob tensão.

As propriedades mecânicas de maior interesse em filmes são as que estão relacionadas com a resistência à tração, ou seja, a força necessária para estirar ou deformar o filme e a deformação alcançada pelo mesmo até a ruptura. Sendo que estas propriedades são dependentes das condições ambientais, como: temperatura e umidade relativa do ar. As características mecânicas de um filme polimérico são também influenciadas pela temperatura de transição vítrea do polímero .

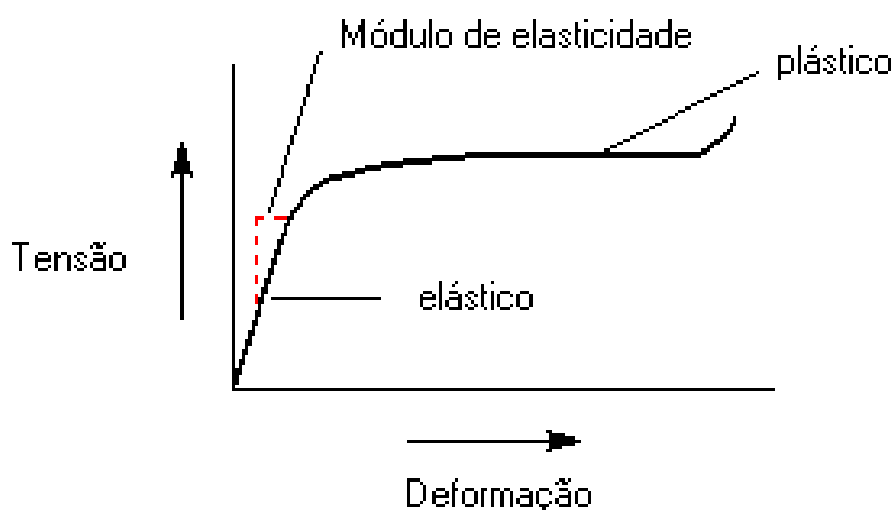


Figura 5 – Gráfico Tensão-Deformação

Fonte:²⁷

As principais propriedades mecânicas avaliadas em filmes poliméricos são a deformação elástica que consiste na habilidade dos materiais recuperarem sua forma inicial após sofrerem uma deformação. O módulo de elasticidade (módulo de Young) que é a relação linear entre a tensão aplicada e a deformação sofrida, é determinado pela inclinação da curva de tensão vs. deformação na região elástica. Outra importante propriedade mecânica exibida por filmes poliméricos é a capacidade de deformação sem sofrer ruptura.

Arvanitoyannis e Biliaderis²⁹ ao analisarem as propriedades mecânicas de blendas poliméricas de amido-metilcelulose, verificaram que o aumento do conteúdo de água ou de

plastificante (glicerol, sorbitol e xilose) resultou em um aumento da percentagem de alongação da amostra dos filmes devido a extensiva plastificação destes polímeros.

O glúten de trigo foi extensivamente estudado como agente formador de filme^{30, 31,32}. Estudos de Gontard e colaboradores^{31, 33} indicaram que a formação de um filme homogêneo de uma solução formadora de filme de glúten requereu o uso de condições alcalinas ($\text{pH} > 10,5$) ou ácidas ($\text{pH} < 5$). Investigações na literatura nos levam a acreditar que como o ponto isoelétrico das proteínas do glúten é em torno de 7,5¹⁶, a solubilidade e a formação do filme requerem que os resíduos de aminoácidos do grupamento N-terminal, C-terminal e dos resíduos laterais em posição intermediária estejam na forma catiônica ($\text{pH} < 5$) ou na forma aniônica ($\text{pH} > 10,5$). Os filmes não plastificados não puderam ser objetos de análise de propriedades mecânicas pois ficaram muito quebradiços e de difícil manipulação. O glicerol (agente plastificante) diminuiu a força de penetração do filme de glúten e aumentou a deformação na ruptura a concentrações maiores que 15g/100g de matéria seca.

Segundo os autores citados acima^{31,33}, o alto conteúdo de glutamina (cerca de 45%) nas proteínas do glúten de trigo é responsável pela presença de um grande número de ligações de hidrogênio entre as cadeias de proteínas. Esta característica contribui para a alta coesividade das interações proteína-proteína e como consequência a baixa flexibilidade do filme de glúten não plastificado.

As proteínas da clara do ovo também têm sido objeto de estudo na formação de filmes biodegradáveis e comestíveis. Handa e colaboradores³⁴ determinaram, as propriedades mecânicas, solubilidade de matéria seca total e perfil eletroforético de filmes de proteínas de clara de ovo. Os valores encontrados para tensão máxima variaram de 4,27 a 5,28 Mpa. Os filmes cujas soluções formadoras sofreram tratamento térmico apresentaram valores maiores de tensão máxima do que os derivados de soluções não aquecidas, enquanto os valores de tensão máxima não variaram com o pH. A deformação na ruptura variou de 26,4 a 55,1%, sendo que os filmes de soluções aquecidas tiveram uma deformação maior do que filmes de soluções não aquecidas, no intervalo de pH estudado (10,5-11,5). De um modo geral a deformação aumentou com o aumento do pH.

A solubilidade de matéria seca total esteve entre 44,9 e 50,9%, tendo decrescido linearmente com o aumento do pH. A eletroforese em gel de poliacrilamida, quando a uréia

(possui habilidade de romper ligações de hidrogênio e hidrofóbicas) e 2-mercaptoetanol (capacidade de quebrar ligações dissulfeto) foram incluídos na preparação das amostras, não apresentou diferença observável entre as proteínas da clara de ovo em pó, nas soluções formadoras de filme ou mesmo no filmes secos. Sugerindo que a formação de filmes de proteínas de clara de ovo não envolve outras ligações covalentes além de pontes dissulfeto. Reforçando esta hipótese, as amostras de filmes oriundos de soluções aquecidas apresentaram dificuldade de solubilização no tampão utilizado para a eletroforese sem a adição de 2-mercaptoetanol.

Galiotta e colaboradores³⁵ avaliaram o efeito do glicerol, como plastificante, e de agentes promotores de ligações cruzadas (formaldeído e cloreto de cálcio) na solubilidade em água e nas propriedades termomecânicas de filmes de proteínas do soro do leite. O aumento do conteúdo de plastificante diminuiu a resistência mecânica (força na ruptura) e o módulo de elasticidade e aumentou a deformação na ruptura (de 0,3 mm com de 25% glicerol para 0,9 mm com 40% de glicerol). Estas alterações nas propriedades mecânicas são devido a modificações na organização tridimensional, diminuição da densidade e reversibilidade de interações intermoleculares ocorrendo na rede de proteínas do soro do leite que formam o filme, aumento do volume livre e mobilidade da cadeia. O glicerol é uma molécula hidrofílica de baixa massa molar que pode facilmente colocar-se entre as cadeias protéicas e estabelecer ligações de hidrogênio com grupos reativos das cadeias de proteínas. A adição de formaldeído, como agente de entrecruzamento, na formulação de filmes de proteínas do soro do leite, induziu à alterações nas propriedades mecânicas, isto é, um aumento da tensão de ruptura e no módulo de elasticidade.

Em relação à solubilidade (*g de matéria seca solubilizada/100 g de matéria seca inicial*) dos filmes em água, esta aumentou com o conteúdo de glicerol e diminuiu com o de formaldeído. O aumento do conteúdo de glicerol em filmes com base em proteínas do soro do leite envolveu numa diminuição da temperatura de transição vítrea, o que pode, segundo os autores, estar associado com uma diminuição na densidade das interações intermoleculares. O efeito depressor da incorporação de plastificantes hidrofílicos na temperatura de transição vítrea foi típico para polímeros termoplásticos hidrofílicos^{18, 30, 36, 37, 38}.

Anker e colaboradores³⁹ estudaram as propriedades mecânicas, conteúdo de umidade e temperatura de transição vítrea em filmes de proteína do soro do leite a vários valores de pH, usando sorbitol como plastificante. Os autores observaram que o conteúdo de umidade dos filmes aumentava com o aumento de pH. Ao afastar-se o pH do ponto isoelétrico ocorre um aumento do número de carga na molécula, facilitando desta forma a adsorção de água pelos filmes. Segundo os autores, as propriedades mecânicas de filmes de proteínas do soro do leite são dependentes da concentração crítica de gelificação (a concentração mínima necessária para formar um gel, sob condições experimentais). Ou seja, os valores do módulo de elasticidade e tensão de ruptura apresentaram um máximo na concentração crítica para pH 7 e 8. No entanto para pH 9 o máximo apresentado foi para uma concentração acima da concentração crítica. A altos valores de pH as proteínas tornam-se mais negativamente carregadas, o que resulta em uma maior repulsão eletrostática, perturbando as interações proteína-proteína. Similarmente, a deformação na ruptura também alcançou valores máximos na concentração crítica, significando que a estrutura mais favorável com relação ao estiramento dos filmes é formada nesta concentração. Os autores observaram ainda que a temperatura de transição vítrea dos filmes de proteínas do soro diminuiu com o aumento do pH.

1.4.6 Transição Vítrea

Uma característica de um material amorfo é sua temperatura de transição vítrea, T_g , a temperatura na qual suas propriedades mudam de um material elástico para um sólido. O comportamento da transição vítrea de muitos polímeros sintéticos é bem conhecido²⁷. Recentemente, o comportamento da transição vítrea de biopolímeros incluindo proteínas e polissacarídeos têm sido objeto de pesquisas^{18,36,37,40}.

Kalichevsky e colaboradores¹⁸ encontraram valores para a temperatura de transição vítrea para a caseína e caseinato de sódio desidratado (144°C e 130°C, respectivamente), obtidos pela extrapolação para concentração zero de plastificante (frutose e água) através da equação de Gordon-Taylor. Macromoléculas como a proteína do glúten de trigo ($T_g = 162^\circ\text{C}$), amilopectina ($T_g = 227^\circ\text{C}$) e zeína ($T_g = 188^\circ\text{C}$) [30] apresentaram valores relativamente próximos.

A temperatura de transição vítrea (T_g) de filmes de glúten de trigo foi determinada através de DSC e por DMTA³⁷. Para as técnicas empregadas, o valor da temperatura de

transição vítrea decresceu com o conteúdo de água., sendo de 384K para o filme seco (0% de água). Já Cherian e colaboradores³⁶ utilizaram DSC e DMTA para medir a T_g de filmes de glúten de trigo contendo glicerol, sacarose, glicerol-sacarose e glicerol-sorbitol. O sorbitol mostrou-se miscível com o glicerol e o glúten, resultando em um único pico de transição (DSC e DMTA), intermediário ao pico de transição da glicerina e sorbitol. Entretanto a sacarose mostrou-se incompatível com os componentes do filme, resultando em uma separação de fase.

Kalichevsky e Blanshard⁴¹ determinaram a temperatura de transição vítrea (T_g) e as propriedades mecânicas de misturas binárias dos biopolímeros amilopectina, caseína e glúten, na proporção 1:1, em presença de água. As amostras foram moldadas em pastilhas sob pressão. Termogramas de DSC das blendas biopoliméricas apresentaram duas transições térmicas, sugerindo a imiscibilidade do sistema. O aumento da concentração de água nas blendas reduziu as temperaturas de transição vítrea de ambos os componentes.

Di Gioia e colaboradores³⁰ encontraram o valor de 188°C para a temperatura de transição vítrea (T_g) do glúten de milho utilizando análise termomecânica. Ao analisar a variação da T_g em função do conteúdo de plastificante, foi encontrada uma maior eficiência plastificante com o aumento da massa molar: poli etileno glicol > trietanolamina > dietanolamina > glicerol > uréia (Mm = 300, 149, 105, 92 e 60 g/mol, respectivamente).

Os resultados apresentados por Di Gioia e colaboradores³⁰ para o efeito plastificante destas moléculas, são conflitantes com os relatados na literatura, principalmente com o reportado por Cuq e colaboradores⁴² para glicerol, sorbitol ou sacarose em proteínas miofibrilares de peixe; água, glicerol ou sorbitol em proteínas do glúten⁴¹ e para frutose, sacarose ou glicose em glúten de trigo conforme reportado por Kalichevsky e colaboradores⁴³.

Roy e colaboradores⁴⁴ estudaram as propriedades físicas e moleculares de filmes de glúten de trigo formados a partir de soluções filmogênicas aquecidas. A solubilidade dos filmes decresceu com o aumento da temperatura de aquecimento das soluções formadoras de filmes. Este efeito foi atribuído a uma desnaturação térmica mais pronunciada com a elevação da temperatura de aquecimento. O tratamento térmico de filmes diminuiu a solubilidade em água de filmes de glúten de trigo, zeína do milho, gelatina, colágeno e proteína de soja.

1.4.7 Propriedades de barreira a gases e vapor de água

As propriedades de transporte de gases e vapor de água são geralmente descritas por três coeficientes: difusão (o grau de movimento de uma molécula permeante através de uma matriz polimérica), solubilidade (o comportamento de partição de uma molécula permeante entre a superfície do filme polimérico e uma posição vizinha na matriz polimérica) e permeabilidade (a taxa de transporte de uma molécula permeante através do filme polimérico como resultado do efeito combinado da difusão e solubilidade)⁴⁵.

Filmes comestíveis preparados a partir de proteínas (zeína do milho e glúten de trigo) e celuloses (metilcelulose e hidroxipropil celulose), foram estudados em relação à permeabilidade a gases⁴⁶. Os autores observaram um aumento da permeabilidade a O₂, CO₂ e vapor de água nos filmes de celulose com o aumento da concentração de plastificante. Por outro lado à adição de lipídeos no filme de hidroxipropil celulose diminuiu a permeabilidade a gases.

Filmes de proteína de clara de ovo-lipídeo (ácido oleico, gordura do leite e fosfolipídeo da gema do ovo) foram estudados por Handa e colaboradores⁴⁷. Estranhamente os lipídeos não reduziram a permeabilidade ao vapor de água. O ácido oleico aumentou a tensão máxima e a deformação na ruptura dos filmes. Além disso, aumentou a concentração de grupos sulfidrílicos na superfície, o que segundo os autores foi devido ao incremento de cargas negativas na molécula, ocasionando a desnaturação das cadeias protéicas e exposição de grupos SH, antes voltados para o interior da molécula.

Mahmoud e Savello⁶ avaliaram filmes de proteínas do soro do leite polimerizadas com a enzima transglutaminase. A transglutaminase é capaz de catalisar a formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina, formando o entrecruzamento ϵ -(γ -glutaminil)lisina. Os filmes apresentaram resultados muito semelhantes para o conteúdo de umidade, apresentando uma alta capacidade de retenção de água. Entretanto, a concentração de glicerol presente nos filmes influenciou significativamente a percentagem de umidade presente. Segundo os autores as características do glicerol por ser uma molécula de plastificante muito hidrofílica que possui a capacidade de solubilizar as proteínas, favorece a retenção e difusão de água na matriz protéica. Os filmes de α -lactoalbumina foram ligeiramente mais permeáveis ao vapor de água do que os filmes de β -lactoglobulina. Já os de α -lactoalbumina/ β -lactoglobulina foram mais permeáveis do que os

filmes das frações puras das proteínas. Em termos da resistência à ruptura, esta foi menor em filmes de α -lactoalbumina do que os de β -lactoglobulina. Por outro lado, na presença de 2% de glicerol na solução formadora de filmes de β -lactoglobulina, a tensão de ruptura do filme foi de 1800 g/cm², enquanto que com 1% de glicerol a força caiu para 400 g/cm².

Esta tendência não é de consenso na literatura, já que alguns autores^{24,31,34,39} relataram um comportamento contrário em termos de concentração de aditivo presente na solução. Provavelmente a espessura do filme foi um dos aspectos preponderantes na análise de tensão de ruptura.

McHugh e colaboradores¹⁷ estudaram os efeitos do tempo, temperatura, concentração de proteína e pH na permeabilidade ao vapor de água de filmes de proteínas do soro do leite plastificados com o uso de polietilenoglicol, glicerol e sorbitol. A completa formação de filmes foi observada após 30 minutos a 75°C, provavelmente porque a esta temperatura ocorre a formação de ligações dissulfeto e portanto a estabilização do sistema. Os efeitos da concentração na permeabilidade ao vapor de água não foram significantes nos filmes formados a partir de soluções de proteínas do soro de 8% a 10%. Filmes a pH 6,0 tiveram valores de permeabilidade ao vapor de água maiores quando comparados com filmes a pH 7 a 9. Os valores a pH 7, 8 e 9 não apresentaram diferenças significativas. Segundo os autores, isto pode ser devido a inibição parcial às reações de oxidação de grupos tiol a pH ácidos. A concentrações iguais, os filmes plastificados com sorbitol exibiram valores mais baixos de permeabilidade ao vapor de água do que os filmes plastificados com glicerol, polietilenoglicol 200 e 400. O efeito da concentração de glicerol na permeabilidade ao vapor de água foi estudado pelos autores. Estes encontraram uma relação linear positiva entre a concentração de glicerol e os valores de permeabilidade ao vapor de água. Foi observado um efeito exponencial entre a permeabilidade ao vapor de água e umidade relativa empregada para seu cálculo.

Pérez-Gago e colaboradores⁴⁸ estudaram a permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e propriedades mecânicas de filmes de proteínas do soro do leite em estado nativo e desnaturadas. O pH da solução formadora do filme não apresentou nenhum efeito significativo na solubilidade do filme em água, nas propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água. No entanto, as soluções de proteínas do soro do leite desnaturadas termicamente originaram filmes com tensão de ruptura maior do que filmes de

proteínas nativas. Os autores sugerem que a formação de ligações cruzadas através de ligações dissulfeto de proteínas do soro do leite é responsável pela insolubilidade em água e alterações nas propriedades mecânicas de filmes originários de soluções tratadas termicamente.

Parte Experimental

2.1 Preparação das amostras

Foram preparadas soluções aquosas de caseinato de sódio comercial (New Zeland Milk Products) - Alanate 180 (proteína 93,0%, lactose 0,1%, lipídeos 1,0%, umidade 4,1% e minerais 1,8%) nas concentrações de 10,5; 11; 11,5; 12; 12,5 e 13%, a um pH de 6,5. As soluções foram preparadas com água destilada, por agitação constante (2 horas), em temperatura ambiente (20°C), e utilizadas assim que preparadas ou após um máximo de 2 dias, quando mantidas a 4°C. As soluções foram descartadas após este período para evitar possíveis alterações como: crescimento microbiano e envelhecimento das soluções.

As soluções aquosas de sistemas proteína/plastificante foram preparadas nas concentrações de 10, 12 e 13% (massa de proteína/massa de solvente). Para cada solução foi variada a concentração de sorbitol entre 0,2 e 20 g de sorbitol/ 100 g de solução, mantendo-se fixa a concentração de caseinato de sódio. Estas soluções foram preparadas e armazenadas de maneira similar as soluções contendo apenas caseinato de sódio.

2.2 Reologia das soluções

O comportamento e propriedades reológicas das soluções de caseinato de sódio (CS) e de caseinato de sódio com adição de sorbitol (S) foi determinado, em triplicata, à 17°C, 20°C, 25°C e 30°C com um Reômetro *Brookfield LVDV-III*CP, do tipo cone-prato, utilizando-se um cone *CP-52* (volume da amostra de 0,5 mL; ângulo do cone de 3.0° e diâmetro do cone de 24 mm). O reômetro estava equipado com banho termoeletrificado para controle da temperatura, acoplado em computador para utilização do software *Rheocalc32*.

2.3 Densidade das soluções

O volume específico parcial do caseinato de sódio em solução aquosa e em solução aquosa contendo sorbitol foi determinado utilizando-se um densímetro *DMA 48 Densitymeter* (*Anton Paar, Austria*), calibrado com água e ar. Uma massa conhecida de caseinato de sódio, primeiramente seca em dessecador com sílica, a vácuo até peso

constante, foi adicionada em uma massa conhecida de solvente e o volume total foi obtido a partir da massa total e densidade da solução.

2.4 Preparação dos filmes

Soluções aquosas a 10% de caseinato de sódio e a 10, 20, 30, 40 e 50% de sorbitol em relação à massa de proteína (g sorbitol / g caseinato sódio) foram preparadas com agitação constante, por um período de 2 horas. As soluções foram espalhadas em placas de petri de poliestireno para evaporação do solvente a temperatura ambiente (25°C) em capela e os filmes armazenados para posterior utilização e análises.

2.5 Propriedades Estruturais

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite o estudo de amostras de filmes em seu estado original, possibilita a visualização de possíveis imperfeições, porosidades, separação de componentes dos filmes em camadas, estrutura da superfície e visão da estrutura da seção transversal. O microscópio eletrônica de varredura produz uma imagem a partir de um feixe de elétrons que varre a superfície de uma amostra, a imagem é produzida pelo feixe de elétrons refletidos pela superfície^{49,50,51}.

As micrografias foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura modelo Philips XL 30. As amostras para a análise por MEV foram fraturadas em nitrogênio líquido, com o objetivo de evitar a mobilidade das cadeias poliméricas, o que poderia distorcer as estruturas da superfície de fratura. As amostras foram metalizadas (metalizador modelo *P-S2 Diode Sputtering System* fabricado por *Internacional Scientific Instruments*) com uma fina camada de ouro, antes da análise

2.6 Propriedades Mecânicas

Um aparelho de ensaio mecânico EMIC com célula de carga de 50 kgf, foi utilizado para determinar a tensão máxima, tensão de ruptura, alongação na ruptura e módulo de elasticidade (módulo de Young) dos filmes de caseinato de sódio e com adição de plastificante (sorbitol) pelo método de tração. O método ASTM D882-95a (*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*) [52] compreende a determinação de propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes

(com menos de 1,0 mm de espessura). As condições de temperatura e umidade relativa do ar no laboratório onde foram efetuados os testes eram de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $50 \pm 5\%$, respectivamente.

Foram efetuadas de dez a quatorze repetições de cada amostra, de dimensões: 100mm de comprimento e 25 mm de largura. A espessura do filme foi medida quando da realização dos ensaios, com o auxílio de um micrômetro de mão (*MITUTOYO 102-217*) com divisões de 0,01 mm, as medidas de espessura utilizadas foram uma média de dez medidas, tomadas aleatoriamente. A separação inicial das garras e sua velocidade de afastamento foram de 50mm e 25 mm min^{-1} , respectivamente. Um microcomputador foi utilizado para gravar as curvas de tensão-deformação com o auxílio de um programa desenvolvido pelo próprio fabricante do equipamento (EMIC). As medidas foram efetuadas dentro de um tempo médio de 5 min para que as condições de temperatura e umidade relativa do ar do laboratório não interferissem nos resultados experimentais.

As amostras foram mantidas por 21 dias em ambiente com diversas umidades relativas do ar (9; 23; 43; 75 e 84%) antes da efetuação das análises mecânicas e da determinação de umidade (g água/g sólidos) por termogravimetria (TGA).

2.7 Temperatura de Transição Vítreas

Foi utilizado um equipamento Shimadzu (Thermo Mechanical Analyser-TMA50H), com fluxo de nitrogênio de 25 mL min^{-1} , com taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, para se determinar tanto a T_g como o coeficiente linear de expansão térmica (α), com um corpo de prova de dimensões (10mm x 3mm) especificadas pelo fabricante do equipamento. Experimentalmente, a temperatura de transição de vítreas corresponde a temperatura na qual a amostra exibe uma variação significativa no valor de α que é definido pela Equação 1, onde L_0 é o comprimento original da amostra e dL/dT é a inclinação da curva de TMA. O valor de α é dependente da temperatura e condições experimentais.

$$\alpha = (dL/dT) (1/L_0) \quad \text{[Equação 1]}$$

As temperaturas das transições vítreas obtidas experimentalmente foram objeto de análise através das equações de Fox (Equação 2) e de Gordon-Taylor (Equação 3), que

relacionam a T_g com a composição, onde w é fração em massa de cada componente, T_g em Kelvin e k é uma constante do sistema inversamente proporcional ao efeito plastificante do componente 1 (sorbitol) no caseinato de sódio (componente 2).

$$1/T_g = (w_1/T_{g1}) + (w_2/T_{g2}) \quad [\text{Equação 2}]$$

$$T_g = (w_1 T_{g1} + kw_2 T_{g2}) / (w_1 + kw_2) \quad [\text{Equação 3}]$$

2.8 Permeabilidade ao Vapor de Água

A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) foi determinada para a condição de 23°C e 75% URE por meio de método gravimétrico, baseado na metodologia ASTM E-96-00 (*Standard test methods for water vapor transmission of materials*). Esse método se baseia no aumento do peso da sílica-gel, colocada no interior de uma cápsula de alumínio e isolada do ambiente de condicionamento pelo material cuja TPVA se deseja conhecer. O ganho de peso foi quantificado em balança analítica Metter, modelo AT 400, com resolução de 10^{-4} g. O condicionamento foi feito em câmara Vötsch – VC 0055, com controle de temperatura e de umidade relativa.

2.9 Permeabilidade ao Oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio foi determinada por método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma ASTM F 1927 (*Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using coulometric detector*), em equipamento OXTRAN, modelo 2/20, da MOCON, operando com oxigênio puro como gás permeante à temperatura de 23°C e a 75% de UR. Durante os ensaios o fluxo de gás inerte (N_2) foi mantido a 10 mL min^{-1} e do oxigênio a 20 mL min^{-1} . A área efetiva da permeação de cada corpo-de-prova foi de 50 cm^2 . O condicionamento dos corpos-de-prova foi feito durante 1 dia, a 23°C e a úmido (ambiente saturado com água). Os resultados obtidos foram corrigidos para 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio.

2.10 Análise Térmica

A estabilidade térmica dos filmes de caseinato de sódio e caseinato de sódio/sorbitol foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA). Os dados de perda de massa em função do tempo e da temperatura foram analisados usando-se o método de Ozawa.

Para o método de Ozawa, os parâmetros foram determinados usando-se o programa associado TGA-50, e a energia de ativação aparente foi obtida da inclinação da dependência da constante de velocidade com o recíproco da temperatura absoluta, numa definida perda de massa, a diferentes velocidades de aquecimento.

2.11 Dicrosimo Circular

Para as medidas de dicrosimo circular foram preparadas soluções de caseinato de sódio/sorbitol e de caseinato de sódio puro em água de qualidade milipore. Todas as soluções foram filtradas utilizando-se um filtro Milipore (0,22 µm). Os espectros foram obtidos utilizando-se um equipamento *Jobin Yvon Spex CD6 (Group Instruments S.A.)*, com uma cubeta termoestabilizada (25°C) de 1mm de caminho ótico. Os resultados foram expressos como elipticidade molar $[\theta]$, através da equação (4):

$$[\theta] = 3300 \cdot \Delta \text{Abs} / c \cdot l \quad \text{[Equação 4]}$$

onde ΔAbs é a diferença na absorbância para os componentes circulares direito e esquerdo da luz incidente, l é o caminho ótico (em cm), e c é a concentração em mol L⁻¹.

2.12 Eletroforese em gel de de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes em um sistema de gel descontínuo composto de acrilamida 4 e 10%, concentrador e fracionador, respectivamente (Laemmli, 1970) [53]. O extrato de caseinato de sódio foi resuspendido em 50mM Tris-HCl (pH 6,8), 1 mM EDTA, e 1 mM DTT, a uma concentração final de 1 mg mL⁻¹. Amostras entre 0,5 a 10 µg foram resuspendidas em solução tampão-SDS (25mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 5% v/v glicerol, 0,1 M DTT, 0,001% w/v azul de bromofenol) e corrida em um dispositivo vertical para eletroforese em gel (Gibco BRL), a 100 V por 5 horas. O

gel foi corado com azul de Coomassie (*Coomassie Blue*) e desidratado entre folhas de celofane.

2.13 Espectroscopia de Infravermelho

As análises de infravermelho (FTIR) foram realizadas num equipamento Perkin Elmer, modelo 16PC, com resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram obtidos a partir de filmes preparados conforme previamente descrito. No processo de degradação térmica foram obtidos espectros de FTIR dos resíduos sólidos e produtos gasosos formados a partir de amostras submetidas ao aquecimento no analisador termogravimétrico (TGA) ou num forno tubular (modelo, etc) com temperatura controlada. Amostras com aproximadamente 15 e 200 mg foram utilizadas no TGA e forno tubular, respectivamente. A velocidade de aquecimento foi mantida a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e a degradação foi realizada em atmosfera de nitrogênio ($50\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$). Os resíduos sólidos formados foram resfriados até temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio e os espectros de FTIR foram obtidos em pastilhas de KBr ou em filmes suportados em SiO_2 . Os produtos gasosos foram coletados em células de gás durante o processo de degradação no forno tubular e submetidos a análise no FTIR. NO espectro de FTIR, o suporte de SiO_2 mostrou duas bandas de absorção em 1106 e 612 cm^{-1} que, obviamente, não foram consideradas na análise dos espectros.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados de eletroforese SDS-PAGE para soluções de caseinato de sódio são mostrados na Figura 6. O dodecil sulfato de sódio (SDS) liga-se a porções hidrofóbicas da molécula de proteína, rompendo a sua estrutura nativa e promovendo uma conformação mais estendida em solução⁵⁴. A partir deste ponto de vista, o deslocamento do complexo SDS-proteína pode ser considerado como sendo proporcional a sua massa molar. Os padrões eletroforéticos apresentados pelas soluções de caseinato de sódio no presente estudo mostram duas frações principais da caseína, as quais estão em conformidade com as frações presentes em maiores quantidades na composição da caseína do leite bovino, ou seja, as frações α_{s1} e β .

Estas frações correspondem a uma massa molar de aproximadamente 25 kDa, quando se compara as colunas de 1-7 com à coluna padrão de massa molar à direita da Figura 6. Duas outras bandas de sinal fraco também aparecem, provavelmente correspondendo as frações α_{s2} e κ , também de massa molar próxima a 25 kDa.

Os resultados apresentados na Figura 6 estão de acordo com o encontrado por Jahaniaval e colaboradores⁵⁵ na composição das frações protéicas de caseinato de sódio, onde as principais frações protéicas encontradas também foram de caseínas β e α_{s1} , com uma área percentual de 34,2 e 48,7%, respectivamente.

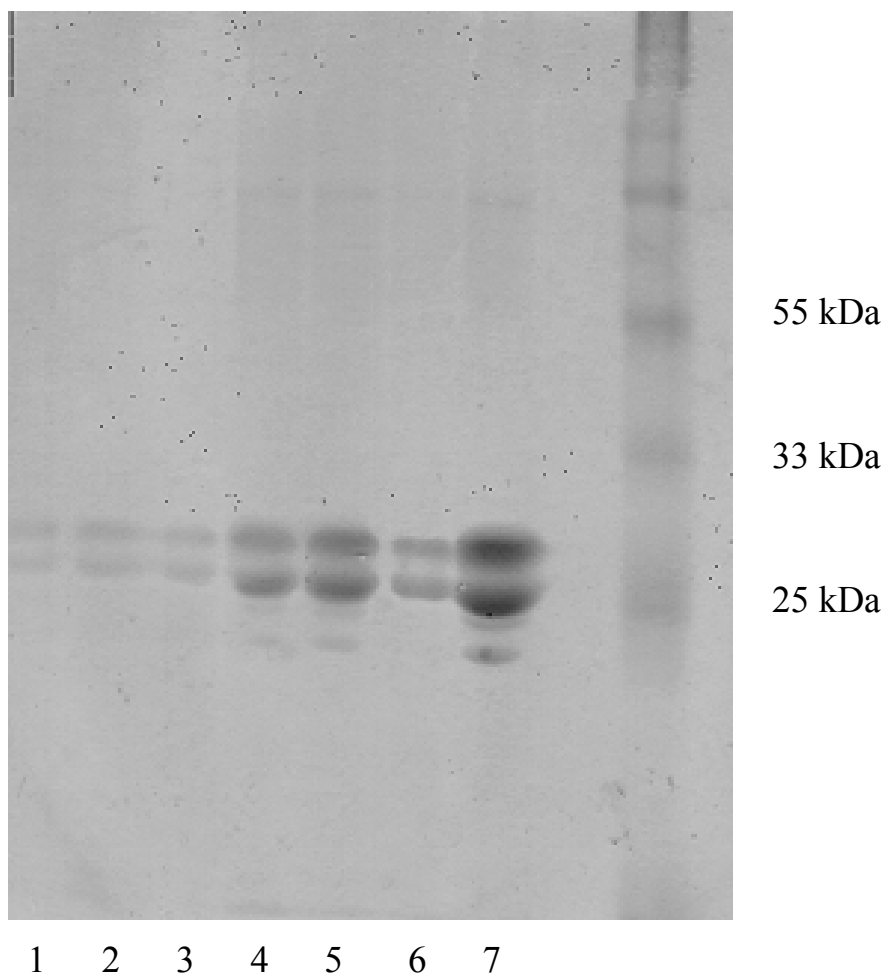


Figura 6 – Gel de eletroforese SDS-PAGE de soluções de caseinato de sódio. Colunas 1-7 representam um gradiente de concentração.

3.2 Comportamento Reológico

Proteínas são polímeros formados por uma sequência de aminoácidos e estes variam em suas características individuais, resultando em uma conformação tridimensional própria de cada molécula protéica. Em compostos de natureza polimérica, principalmente em proteínas, as propriedades reológicas dependem do peso molecular e de sua distribuição, da possibilidade de formação de ligações intermoleculares, da forma adotada pela molécula quando em solução, da concentração, da temperatura em que são efetuadas as medições, do pH, da força iônica, de um processamento prévio ou de um histórico de tratamento, da intensidade da força aplicada sobre a material, entre outros fatores. O comportamento

reológico pode ser ainda independente ou dependente da velocidade de cisalhamento a temperatura e pressão constantes (comportamento newtoniano e não-newtoniano, respectivamente).

Uma solução contendo solutos suspensos possuirá uma maior viscosidade do que o solvente, porque uma energia adicional é requerida para rotacionar, deformar, sobrepujar as interações do tipo soluto-solvente e soluto-soluto e para criar um gradiente de velocidade entre os solutos interdispersos. Desta forma, a viscosidade de uma solução contendo proteína deve ser maior do que a viscosidade do solvente, porém a magnitude desta diferença dependerá de vários fatores como os mencionados acima.

O comportamento reológico das soluções de caseinato de sódio foi estudado em um intervalo de seis (6) concentrações (10,5-13%) e quatro (4) temperaturas (17-30°C). Os resultados experimentais, quando apresentados na forma de gráfico da taxa de cisalhamento pela tensão de cisalhamento, mostraram um comportamento do tipo newtoniano. As Figuras 7 e 8 ilustram este tipo de comportamento descrito pela equação [5].

$$\tau = \eta \cdot \gamma$$

[Equação 5]

Na equação 5, τ é a tensão de cisalhamento (Pa), γ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}) e η (Pa.s) é o coeficiente de viscosidade. O comportamento newtoniano caracteriza-se pela linearidade da relação entre τ e γ e pela independência da viscosidade em relação a taxa de cisalhamento (γ). O comportamento newtoniano de soluções de caseinato de sódio foi previamente observado por Konstance e Strange²².

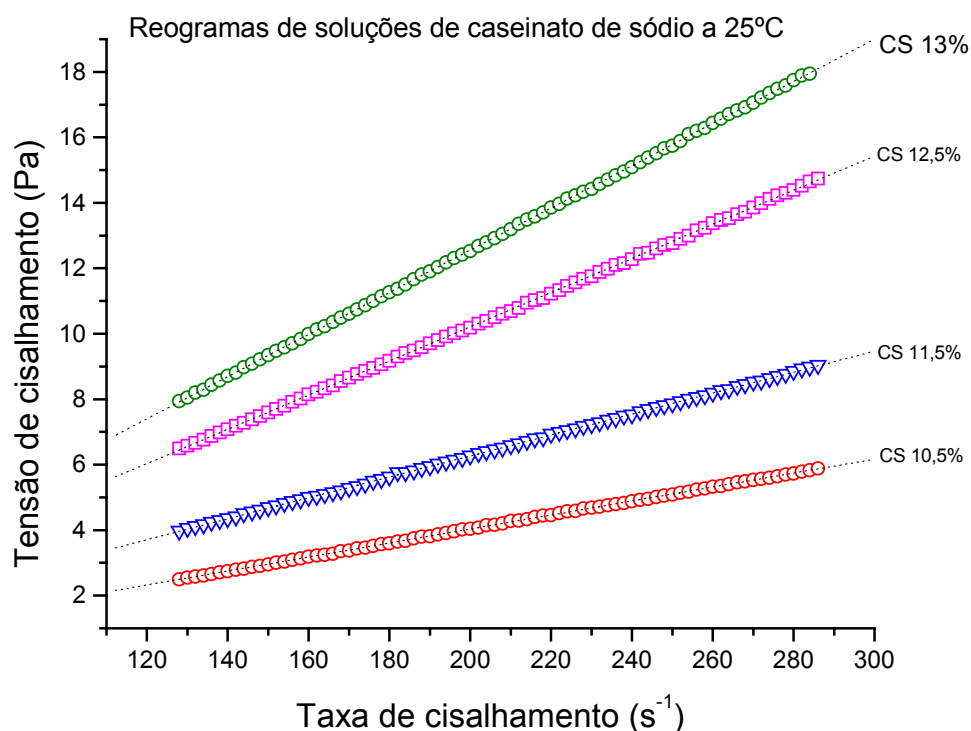


FIGURA 7 – Reogramas de soluções de caseinato de sódio, a diversas concentrações, a 25°C.

Alguns autores^{56,57} têm descrito que a influência da temperatura na viscosidade de soluções pode seguir uma relação do tipo Arrhenius, isto é:

$$\eta = \eta_0 \cdot \exp (E_a/RT) \quad \text{[Equação 6]}$$

onde η é o coeficiente da viscosidade dinâmica (Pa.s), η_0 é uma constante (Pa.s), E_a é a energia de ativação de fluxo (cal.mol^{-1}), R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K). Assim na execução de um gráfico de $\ln \eta$ vs $1/RT$, a energia de ativação de fluxo é obtida pela inclinação da curva. A Figura 9 ilustra o efeito da temperatura na viscosidade das soluções de caseinato de sódio de acordo com a equação de Arrhenius [Eq. 6], enquanto que a Tabela 2 apresenta as constantes para o modelo de Arrhenius. A viscosidade do caseinato de sódio mostrou-se altamente

dependente da concentração, provavelmente refletindo o conteúdo de partículas parcialmente solvatadas.

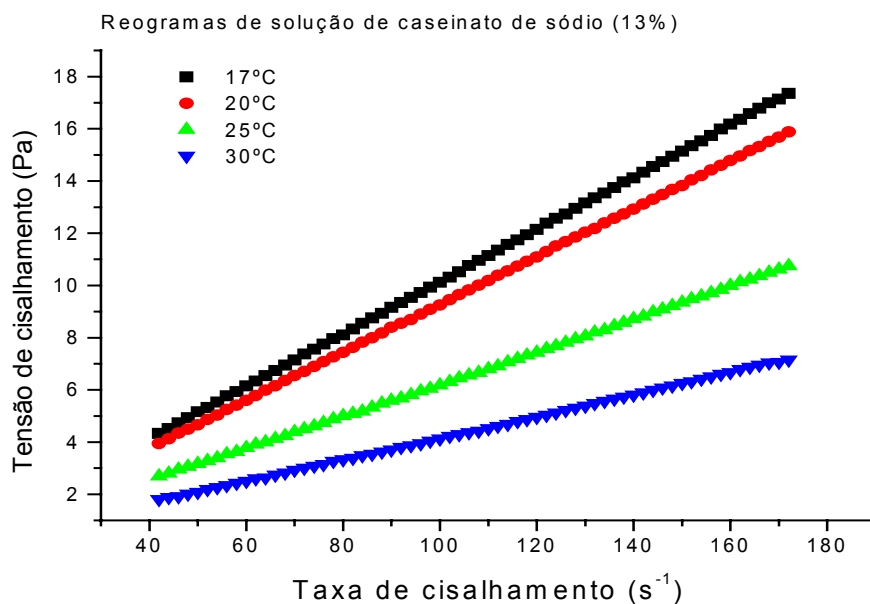


Figura 8 – Reogramas de solução de caseinato de sódio (13%) a várias temperaturas.

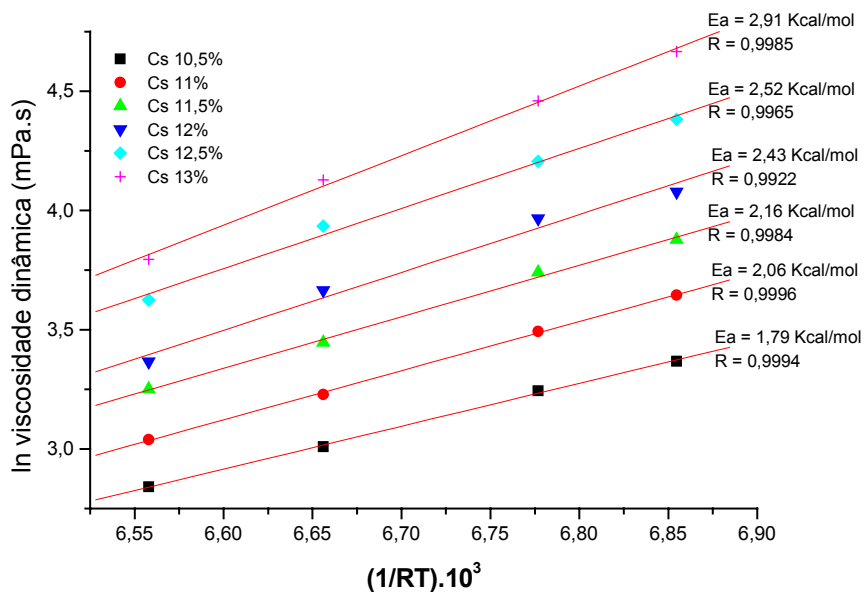


Figura 9 – Efeito da temperatura na viscosidade de soluções de caseinato de sódio, nas concentrações de 10,5%; 11%; 11,5%; 12%; 12,5% e 13%.

Tabela 2 – Constantes do modelo de Arrhenius que relacionam o efeito da temperatura e viscosidade em soluções de caseinato de sódio.

Concentração (%)	E _a (kcal.mol ⁻¹)	η ₀ (mPa.s)	Coefficiente de correlação (R)
10,5	1,79	1,30.10 ⁻⁴	0,9994
11	2,06	2,81.10 ⁻⁵	0,9996
11,5	2,16	1,83.10 ⁻⁵	0,9984
12	2,43	3,68.10 ⁻⁶	0,9922
12,5	2,52	2,61.10 ⁻⁶	0,9965
13	2,91	2,29.10 ⁻⁷	0,9985

Observa-se uma tendência geral de que a energia de ativação de fluxo aumente com a concentração das soluções, indicando que o efeito da temperatura no decréscimo da viscosidade é mais pronunciado a concentrações mais elevadas das soluções de caseinato de sódio. A energia de ativação de fluxo representa a energia para a transição de uma molécula de uma determinada posição de equilíbrio para outra, dentro da solução.

Considerando ainda que a viscosidade de soluções aumenta com a concentração, várias relações têm sido utilizadas para descrever este efeito. Uma destas relações é a chamada Lei das Potências [Equação 7]:

$$\eta = \eta_1.(C)^{A_1} \quad \text{[Equação 7]}$$

A Figura 10 apresenta o gráfico segundo a Lei das Potências, para o efeito da concentração na viscosidade de soluções de caseinato de sódio, a diferentes temperaturas, enquanto que a Tabela 3 relaciona as constantes segundo a mesma equação [7].

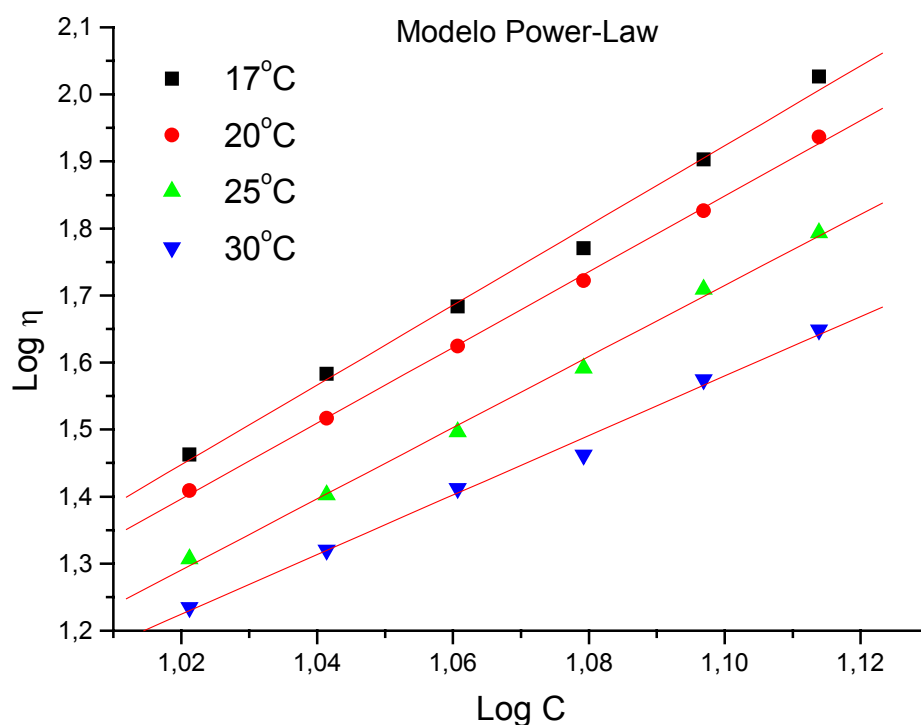


Figura 10 – Efeito da concentração na viscosidade de soluções de caseinato de sódio, segundo a Lei das Potências [Eq.3].

Tabela 3 – Constantes da Lei da Potência para o efeito da concentração na viscosidade de soluções de caseinato de sódio.

Temperatura (°C)	Concentração (%)	η_1 (mPa.s/%)	A_1	Coeficiente de correlação (R)
17	10,5-13	$3,93 \cdot 10^{-5}$	5,95	0,997
20	10,5-13	$2,20 \cdot 10^{-5}$	5,65	0,999
25	10,5-13	$6,78 \cdot 10^{-5}$	5,31	0,998
30	10,5-13	$5,46 \cdot 10^{-4}$	4,44	0,996

Bhattacharya e colaboradores⁵⁸ encontraram valores entre 7,01 e 7,74, para o coeficiente A_1 da Equação 3, em suspensões de farinha de Bengal gram, enquanto Rao e colaboradores⁵⁹ acharam valores para A_1 da ordem de 2,5 em sucos concentrados de tomates; o valor de A_1 , parece ser dependente do tipo e composição dos sólidos presentes.

Os efeitos da concentração e temperatura na viscosidade das soluções de caseinato de sódio foram combinados e representados na Figura 11.

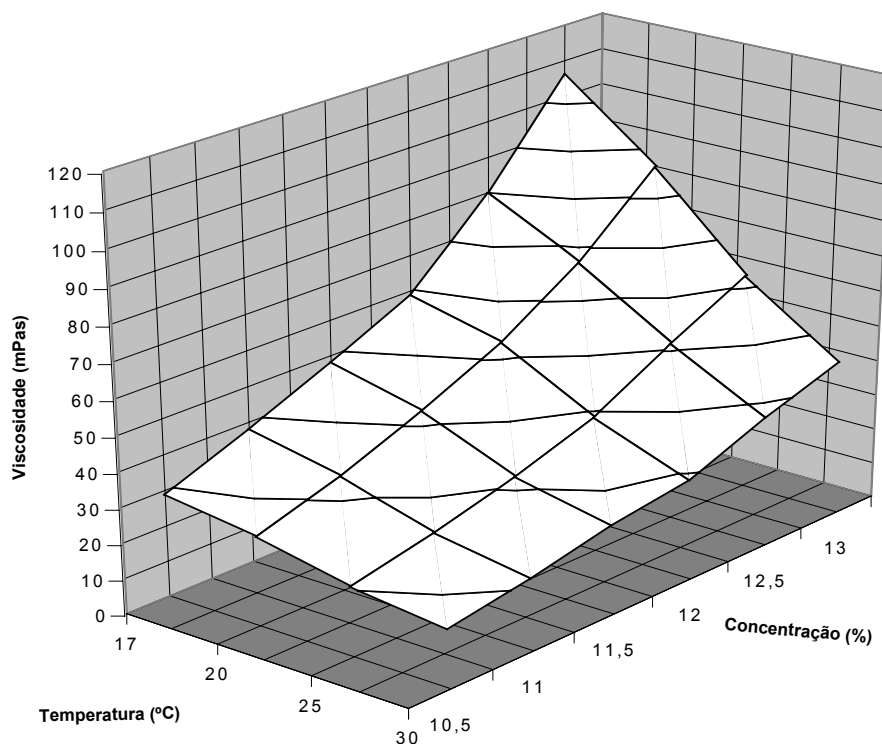


Figura 11 – Viscosidade das soluções de caseinato de sódio em função da concentração e temperatura.

Os resultados experimentais mostram que a temperatura e a concentração possuem uma forte influência na viscosidade de soluções de caseinato de sódio e que os dados obtidos são de utilidade na predição da viscosidade de soluções de caseinato de sódio a diferentes temperaturas e concentrações.

3.3 Comportamento Reológico de Soluções de Caseinato de sódio/Sorbitol

O efeito do sorbitol na viscosidade de soluções de caseinato de sódio foi estudado a várias concentrações. As soluções apresentaram um comportamento reológico do tipo newtoniano, exemplificado na Figura 12, onde se percebe a indenpendência da viscosidade (dada pela inclinação da curva) em relação a taxa de cisalhamento e pelo coeficiente linear

igual a zero ($R = 0,99997$). A Figura 13 mostra um decréscimo da viscosidade das soluções de caseinato de sódio (10%, 12% e 13%) contendo sorbitol.

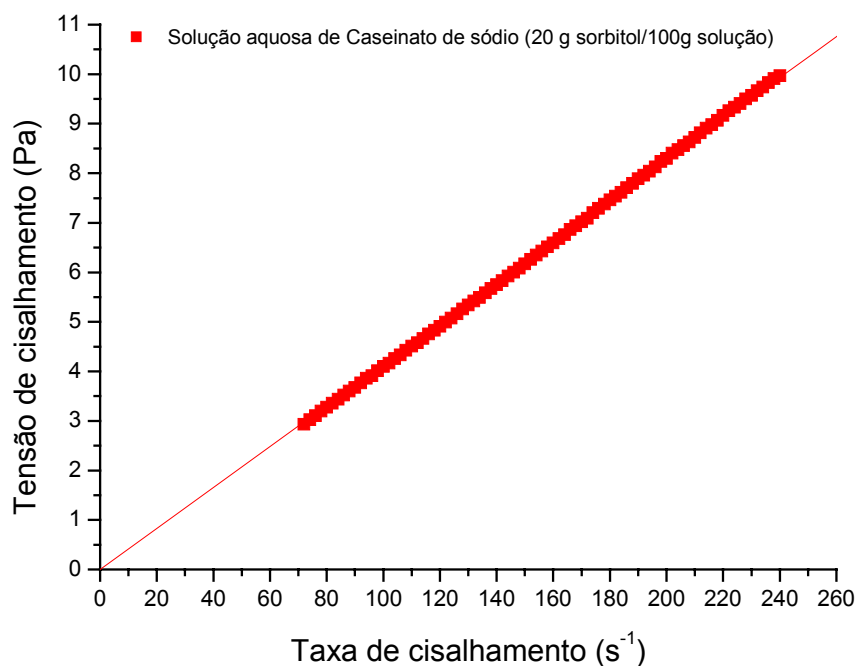


Figura 12 – Reograma de solução aquosa de caseinato de sódio a 12% (p/p) com 20 g sorbitol / 100 g de solução.

Observa-se que na solução de caseinato de sódio a 10% (m/m) o decaimento da viscosidade é menos pronunciado do que na solução a 12% (m/m), e que por sua vez é menor do que na solução a 13% (m/m). Assim à medida que aumenta a concentração da solução de caseinato de sódio ocorre um decaimento da viscosidade mais pronunciado.

À medida que a molécula de um polímero (proteína) absorve solvente, ela intumescce, desdobra-se e torna-se flexível. Tais interações da molécula de proteína com o solvente determinam o grau de solubilidade e o comportamento em fluxo.

Um alto grau de intumescimento é provável que leve a um aumento da flexibilidade da molécula. O intumescimento e o desdobramento, por sua vez, irão aumentar o volume efetivo ou hidrodinâmico das moléculas de proteínas, aumentando assim a viscosidade. O intumescimento, o desdobramento e a flexibilidade da proteína podem também aumentar o raio axial ou eixos de rotação e isto também pode levar a um aumento da viscosidade [21].

O decaimento da viscosidade das soluções em presença de sorbitol sugere que o volume efetivo ou hidrodinâmico das moléculas de caseinato de sódio estão diminuindo com o aumento da concentração de sorbitol. Gekko & Timasheff [60] ao estudarem o mecanismo da estabilização de proteínas (quimotripsinogênio A, ribonuclease A, β -lactoglobulina, soro albumina bovina, lisozima, insulina bovina e α -quimotripsina) em presença de glicerol, relataram uma diminuição no volume molar proteico quando em soluções aquosas contendo glicerol, sendo que os autores não verificaram nenhuma alteração conformacional monitorada por dicroísmo circular e então as alterações puderam ser atribuídas principalmente a solvatação das proteínas.

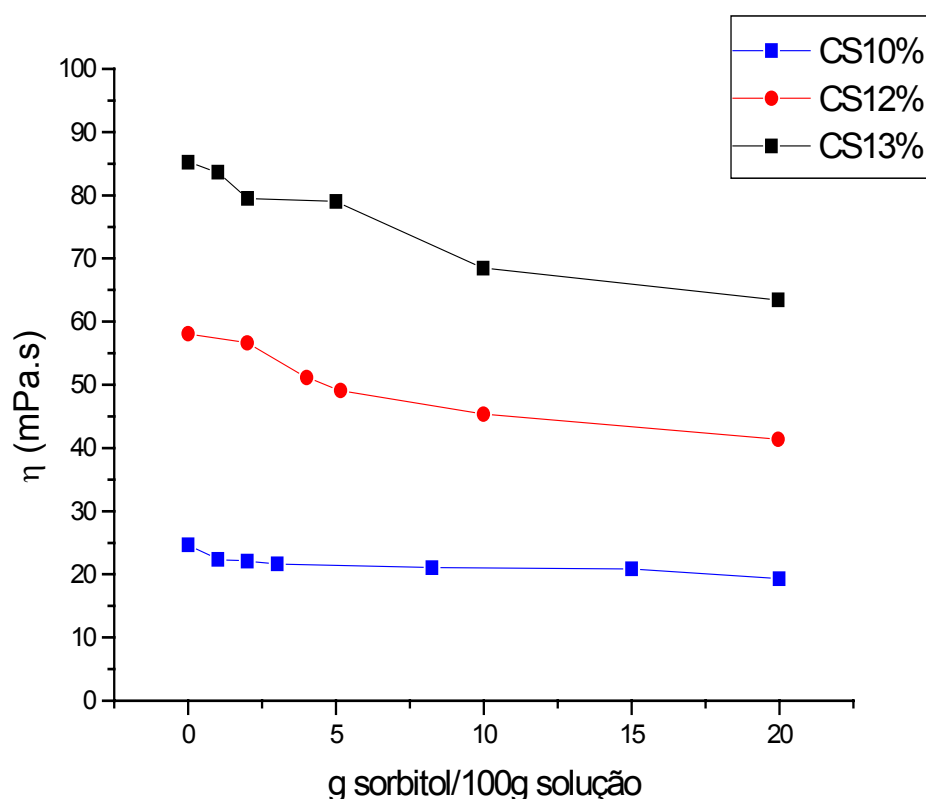


Figura 13 – Efeito do sorbitol na viscosidade de soluções de caseinato de sódio a 20°C.

Já Siew e colaboradores²³ relataram uma diminuição na viscosidade de soluções de caseinato de sódio contendo tanto glicerol quanto polietilenoglicol (400 g/mol). Este efeito foi atribuído ao rompimento de interações proteína-proteína pelo efeito de ligações de hidrogênio das moléculas de plastificante com a cadeia polipeptídica do caseinato e com as

moléculas de água, levando a formação de agregados menores de proteínas em soluções contendo plastificante do que apenas em soluções aquosas.

O sorbitol é um composto altamente solúvel em água (2,3 g/g de água) e portanto interage amplamente com a água e é facilmente incorporado em sua rede de ligações de hidrogênio, perturbando a rede de água que envolve a molécula de proteína

Para ser mantido o equilíbrio termodinâmico, vislumbra-se duas situações que podem estar ocorrendo isoladas ou simultaneamente, quando o sorbitol está presente nas soluções aquosas de caseinato de sódio diminuindo sua viscosidade: primeiro uma mudança conformacional estaria ocorrendo para garantir que todas as áreas hidrofóbicas estejam fora do contato com o solvente ou uma segunda situação em que ocorre uma redistribuição das moléculas de água e sorbitol ao longo da molécula de proteína.

3.4 Determinação do volume específico parcial do caseinato de sódio

Para tentar elucidar melhor o que poderia estar ocorrendo com a molécula de caseinato de sódio em uma solução contendo água e sorbitol, foi determinado o volume específico parcial, já que este pode fornecer informações a respeito da interação proteína-solvente e sobre a característica estrutural da proteína.

O volume de uma solução binária pode ser escrito como:

$$\bar{V} = n_1 \bar{V}_1 + m_2 \bar{v}_2 \quad \text{[Equação 8]}$$

onde \bar{V}_1 é o volume molar parcial do solvente, \bar{v}_2 é o volume específico parcial e m_2 é a massa do polímero. Num gráfico da variação do volume da solução versus a massa do polímero, o coeficiente angular é tomado como sendo o volume específico parcial. As Figuras 14 e 15 mostram os resultados experimentais, indicando uma diminuição no valor do volume específico parcial com o aumento da concentração de sorbitol (cosolvente).

Observa-se que o volume específico parcial do caseinato de sódio é máximo quando o solvente é apenas água, isto é, a estrutura está mais expandida. No entanto, quando se introduz a molécula de sorbitol no solvente, à medida que aumenta a concentração de sorbitol, ocorre uma diminuição do volume específico parcial da molécula de caseinato de sódio, isto é, a estrutura espacial torna-se menos expandida.

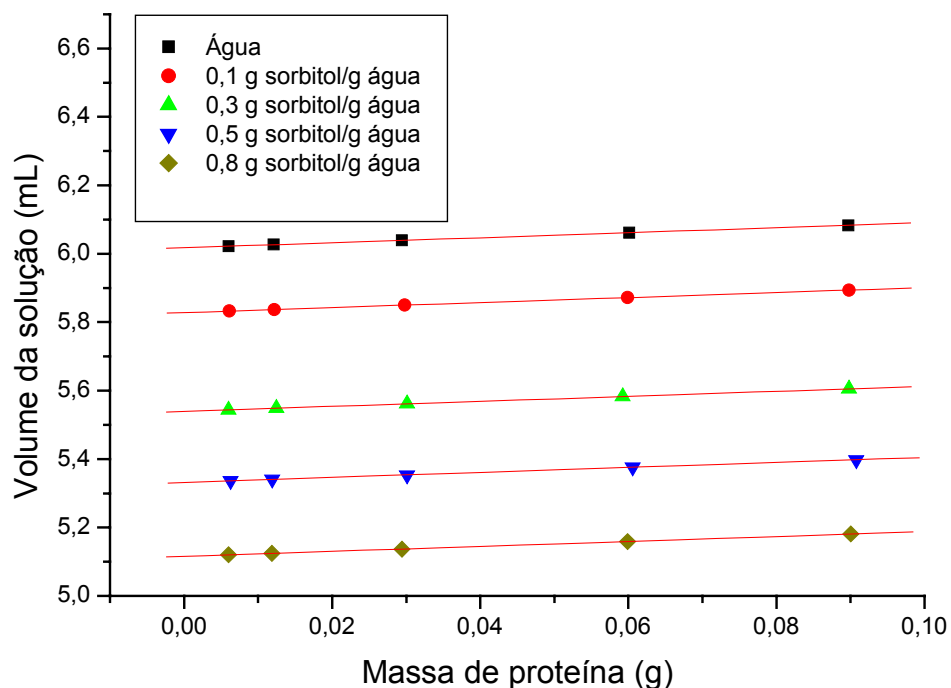


Figura 14 – Gráfico para determinação dos valores de volume específico parcial do caseinato de sódio.

Considera-se que são ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias poliméricas unidas quando o solvente é somente água, conseqüentemente com um volume macromolecular máximo e que quando moléculas de sorbitol são introduzidas neste solvente, esta adição pode romper as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água do solvente e a macromolécula. Levando assim à uma diminuição das ligações de hidrogênio efetivas entre as cadeias poliméricas, através de uma desidratação da proteína, e conseqüentemente uma diminuição do volume específico parcial da molécula de caseinato de sódio e, ocasionando uma diminuição da viscosidade de soluções de caseinato de sódio contendo sorbitol, conforme mostrado anteriormente pela Figura 13.

Na Figura 15 observa-se que não há uma dependência linear do volume específico parcial da molécula de caseinato de sódio com a concentração do cosolvente sorbitol. Kamiyama e colaboradores⁶¹ também encontraram valores dispersos de volume específico parcial ao estudarem este parâmetro na proteína citocromo c em presença de sorbitol.

A variação no volume molar quando a proteína é transferida de uma solução aquosa para uma outra contendo sorbitol é dada pela equação 9.

$$\Delta V = M_2 [\bar{V}_2(\text{em solução de sorbitol}) - \bar{V}_2(\text{em solução aquosa})] \quad [\text{Equação 9}]$$

onde ΔV é a variação no volume molar da proteína. Como indicado pela Figura 11, o volume específico parcial da molécula de caseinato de sódio torna-se menor com o aumento do conteúdo de sorbitol, indicando uma variação negativa no volume ($\Delta V < 0$). Valores que variaram de $-23,23 \text{ mL/mol}$ ($0,1 \text{ g}$ de sorbitol/ g de água) para $-226,55 \text{ mL/mol}$ ($0,8 \text{ g}$ de sorbitol/ g de água).

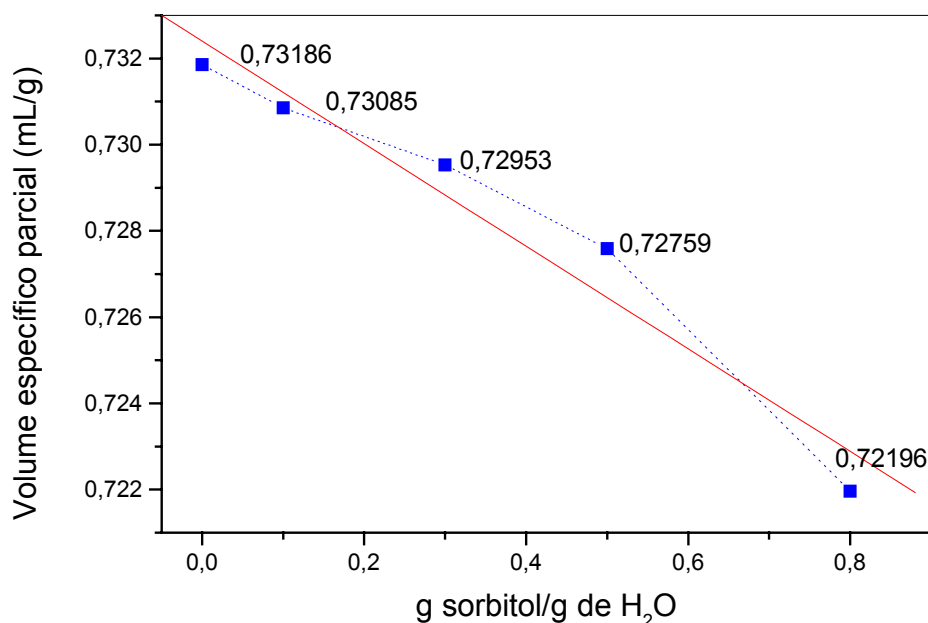


Figura 15 – Comportamento dos valores do volume específico parcial do caseinato de sódio frente ao aumento da molalidade de sorbitol na solução, a linha cheia assume uma dependência linear ($R = -0,9758$).

O volume molar parcial de uma molécula polimérica consiste de duas contribuições: o volume intrínseco da própria proteína, V_{int} (valor positivo), dado pela somatória dos volumes atômicos constitutivos e o volume excluído devido ao empacotamento imperfeito

dos átomos; e, pela alteração no volume causado pela camada de solvatação ao redor da proteína, ΔV_{sol} , geralmente um valor negativo.

$$M_2 \bar{V}_2 = V_{\text{int}} + \Delta V_{\text{sol}}. \quad [\text{Equação 10}]$$

Ao se considerar que não ocorra nenhuma alteração conformacional (principalmente em sua estrutura terciária) da molécula protéica na mudança de uma solução aquosa para outra contendo sorbitol, então a alteração no volume observado, bem como na viscosidade, pode ser atribuída principalmente a solvatação da proteína. De acordo com Gekko [60] o efeito solvente dominante das moléculas de polióis é a estabilização de interações hidrofóbicas, onde a energia livre de transferência da água para soluções aquosas de polióis é positiva para a maioria das cadeias laterais de aminoácidos não-polares, sendo este valor maior com um aumento da concentração de poliol e com o número de grupos OH presentes na molécula.

O valor negativo de ΔV significa que ΔV_{sol} é mais negativo no solvente contendo sorbitol do que em apenas água. Isto poderá ser verdadeiro se o sorbitol puder penetrar na camada de solvatação da proteína e formar uma grande camada de solvatação, contendo agora tanto moléculas de água como de sorbitol, ou se a presença de sorbitol induzir a um ordenamento mais acentuado da camada de hidratação do que o existente previamente, ocasionando uma retirada de moléculas de água do interior da proteína, tornando-a mais compacta com o aumento da concentração de sorbitol.

3.5 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular é normalmente utilizada para determinar alterações na estrutura secundária de proteínas, já que os elementos principais como alfa-hélice, folha-beta e estrutura randômica ou *coil* possuem espectros característicos. A alfa-hélice particularmente possui um espectro que consiste de uma banda intensa e positiva a 190 nm e bandas negativas a 208 e 220 nm¹⁴.

A caseína consiste de um grupo de proteínas, as quais nem são globulares e nem fibrosas. A respeito de seu alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, a caseína mostra uma estrutura aberta e hidratada. Em geral, as caseínas são descritas como possuindo uma estrutura randômica com somente pequenas quantidades de estruturas secundárias, principalmente devido ao teor de aminoácido prolina em sua estrutura primária¹⁶.

Já que o sorbitol não apresenta nenhum sinal no intervalo de comprimento de onda espectral analisado, o espectro de dicroísmo circular observado em soluções água-sorbitol-caseinato de sódio deve ser devido somente à proteína (caseinato de sódio). A Figura 16 mostra o espectro de dicroísmo circular no ultravioleta distante (far UV-CD) na presença e na ausência de sorbitol em solução.

No espectro de dicroísmo circular do caseinato de sódio, o formato da curva e a elipticidade mínima a 203 nm foi atribuída à uma estrutura randômica (*coil*). Uma estrutura randômica pura possui uma banda positiva próximo a 215 nm, a qual não é observada para a molécula de caseinato de sódio em solução aquosa nesta região. Os espectros da molécula de caseinato de sódio em solução água-sorbitol diferem na intensidade e formato, indicando alterações na molécula de caseinato de sódio e o aparecimento de estruturas secundárias.

Observa-se nos espectros de caseinato de sódio obtidos em solução água-sorbitol alterações nos valores da elipticidade molar, tais alterações foram percebidas no intervalo de comprimento de onda de 208-222 nm. A elipticidade a 222 nm reflete a presença de estruturas em alfa-hélice, sugerindo que o caseinato de sódio em soluções água-sorbitol possui uma estrutura secundária mais ordenada e conseqüentemente uma estrutura mais ordenada. De acordo com Subirade e colaboradores⁶² este efeito é atribuível à combinação de dois fatores: (i) o alto momento dipolar dos plastificantes (polialcoóis), o qual induz a ruptura de ligações de hidrogênio de grupos peptídeos através da competição de grupos OH (plastificante) e grupos NH da proteínas na tentativa de ligarem o hidrogênio ao grupo C=O da amida; e (ii) a baixa constante dielétrica que é capaz de perturbar a estrutura da proteína pela redução do efeito hidrofóbico.

Com o aumento do conteúdo de sorbitol (0,8g mL⁻¹), as bandas a 190, 208 e 222, as quais estão correlacionadas com a presença de alfa-hélice, são mais evidentes. Este comportamento está de acordo com medidas hidrodinâmicas e hidrostáticas, tais como viscosidade e volume específico parcial, já discutidas anteriormente, indicando que ocorre uma alteração conformacional na estrutura protéica da molécula de caseinato de sódio na presença de sorbitol, levando à uma estrutura mais compacta e ordenada.

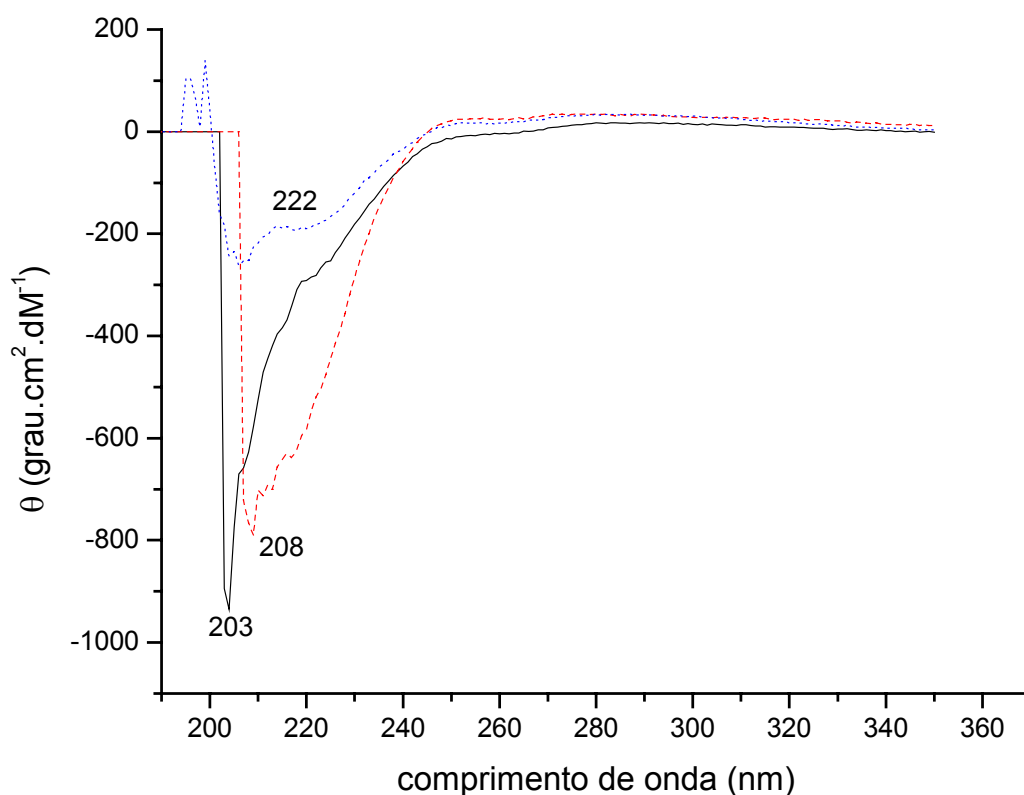


Figura 16 – Espectro de dicrosimo circular no ultravioleta distante de soluções aquosas de caseinato de sódio (linha cheia – preta) e soluções de caseinato de sódio em água-sorbitol com 0,3 (linha tracejada – vermelha) e 0,8 (linha azul – pontilhada) g sorbitol/mL.

3.6 Isotermas de Desorção de Umidade

A existência de moléculas de água com diferentes propriedades num mesmo filme biopolimérico é comprovada quando são traçadas as curvas representativas do teor de umidade, em função da atividade de água no filme. As isotermas de sorção e desorção encontram importante aplicação no cálculo da atividade de água, em misturas de componentes, na estimativa do peso e área da camada primária; no estudo do tipo de embalagem mais adequado ante a capacidade de sorção de água pelo alimento e permitem a previsão do grau de desidratação do alimento diante de mudanças na temperatura ambiente durante o armazenamento.

Isotermas de sorção de água são utilizadas também para descrever a relação matemática entre o conteúdo e a atividade de água de materiais de origem biológica. São ainda importantes para filmes hidrofílicos de biopolímeros já que as propriedades físicas destes filmes são sensíveis à água e o conteúdo ou atividade de água pode influenciar significativamente sua funcionalidade². De acordo com McHugh e Krochta⁸ as propriedades de barreira de um filme dependem tanto do coeficiente de difusão molecular como da solubilidade da água na matriz do filme. As isotermas de sorção de umidade são um meio de caracterizar a solubilidade da água no filme, sendo assim particularmente importante para o filme em estudo.

Vários modelos matemáticos têm sido propostos na literatura que relacionam o conteúdo de umidade e a atividade de água⁶³. Apesar disto são poucos os estudos na literatura relativos às isotermas de sorção em filmes e principalmente considerando o conteúdo de plastificante como variável. São relatados, no entanto, os estudos de Coupland e colaboradores⁶⁴, para filmes de proteínas do soro do leite e de Gennadios e Weller⁶⁵ para filmes de zeína do milho, glúten de trigo e da mistura destes dois componentes. Gontard, Guilbert e Cuq⁶⁶ mostraram que as isotermas de sorção/desorção do glúten de trigo foram muito diferentes do filme formado de glúten do trigo, sendo a curva de sorção/desorção do filme em forma de sigmóide enquanto que a curva da proteína do glúten do trigo apresentou um aumento com o incremento da atividade de água (formato da letra J). Chinnan e Park⁶⁷ observaram formas similares para isotermas de sorção de filmes de metilcelulose e hidroxipropilcelulose.

As isotermas de desorção de água características dos filmes de caseinato de sódio plastificados com 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (g sorbitol/g caseinato de sódio) são apresentadas na Figura 17.

A capacidade de desorção de umidade foi maior para os filmes com menor conteúdo de sorbitol nos intervalos de baixa atividade de água ($0,09 - 0,43 a_w$) ao passo que foi muito menor nos intervalos de maior atividade de água ($0,43 - 0,84 a_w$). Acima de $0,43 a_w$ a diferença na capacidade de desorção de água foi muito pronunciada. Yang e Paulson² e Gontard e colaboradores⁶⁶ observaram uma tendência similar quando compararam filmes de goma gelana com a goma gelana em pó, e de filmes glúten do trigo com glúten de trigo nativo, respectivamente. Gontard e colaboradores⁶⁶ atribuíram, ainda, à diferença na

capacidade de sorção a modificações na conformação da proteína durante a formação do filme e a alta hidrofiliicidade do plastificante utilizado, no caso o glicerol.

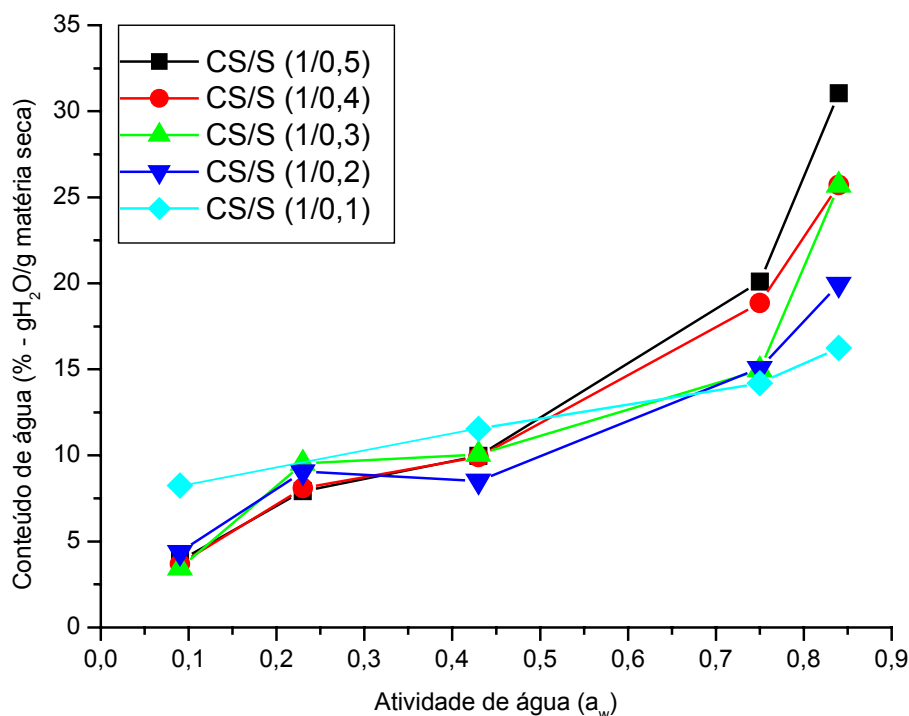


Figura 17 – Isoterma de desorção de água de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol.

As formas das isotermas de sorção/desorção também dizem respeito à maneira com que a água é adsorvida ou desorvida dos materiais biológicos. De acordo com Fennema⁶⁸ as isotermas de forma sigmóide são características da maioria dos alimentos. Já alimentos como frutas, produtos de confeitaria e extratos de café que contêm grandes quantidades de açúcar e de outras moléculas pequenas solúveis e são pobres em polímeros exibem isotermas do tipo em forma da letra J (jota). Ainda segundo Fennema⁶⁸ as formas e posições das isotermas são determinadas por diversos fatores entre os quais figuram a composição da amostra, a estrutura física da amostra (cristalina ou amorfa), os pré-tratamentos, temperatura e metodologia de obtenção.

De acordo com a forma apresentada pelas isotermas de desorção dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol (tipo sigmóide), verifica-se uma concavidade para cima contínua a partir de valores de atividade de água (a_w) de 0,43 a qual é típica para filmes biopoliméricos sensíveis à água. Cuq e colaboradores⁶⁹ relataram o mesmo formato sigmóide para filmes de proteínas miofibrilares e afirmaram ser este um formato típico de materiais com alto conteúdo protéico e que isto é um indicativo de que a água é adsorvida em camadas multimoleculares de acordo com a teoria de Brunauer-Emmet-Tellet (BET). Curvas de isotermas de umidade de formato sigmóide similar foram previamente encontradas em vários filmes formados a partir de hidrocolóides^{70,71}.

Lim e colaboradores⁷² relataram que o formato sigmoidal das curvas de isoterma de sorção/desorção de umidade sugere a formação de agrupamentos de moléculas de água na matriz polimérica com o aumento da atividade de água, seguido de um intumescimento da matriz o que pode ocasionar a exposição de um número maior de sítios de ligação para a sorção de água.

O conteúdo de umidade no equilíbrio aumentou, para as diversas composições de filmes aqui estudadas. Este aumento foi aproximadamente linear com o conteúdo de sorbitol em todas as umidades relativas da atmosfera de acondicionamento, como mostrado na Figura 18.

Dois modelos matemáticos (Equações 11 e 12) foram testados com o objetivo de relacionar os dados experimentais das isotermas dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol a 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (g sorbitol/g caseinato de sódio). Na equação de Oswin m corresponde ao teor de água (g água/g de matéria seca), a_w equivale à atividade de água, k e b são constantes.

$$m = k \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^b, \quad \text{[Equação 11]}$$

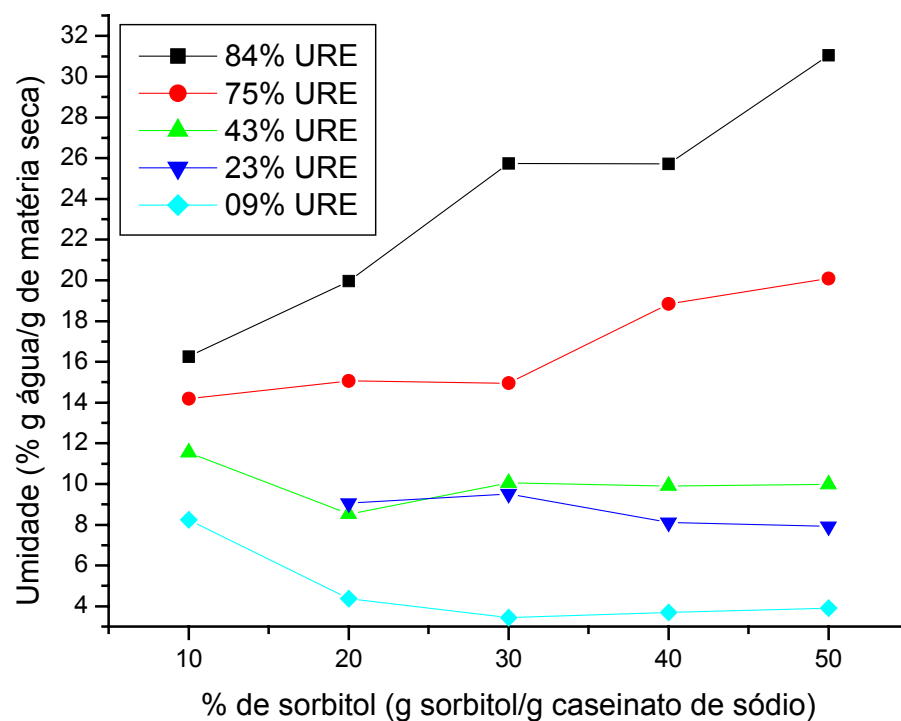


Figura 18 – Gráfico do conteúdo de umidade no equilíbrio dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol após serem mantidos a diversas umidades relativos do ar.

O outro modelo matemático aplicado foi o de Brunauer-Emmet-Tellet (BET):

$$\frac{a_w}{m(1 - a_w)} = \frac{C - 1}{m_1 C} a_w + \frac{1}{m_1 C}, \quad \text{[Equação 12]}$$

onde m = g água/g de matéria seca, a_w = atividade de água, m_1 = g água/ g de sólidos, na região de sorção primária e C é uma constante.

Nas Figuras 19 e 20 são mostrados os gráficos para obtenção dos parâmetros conforme as equações de Oswin e BET, os quais são apresentados na Tabela 4.

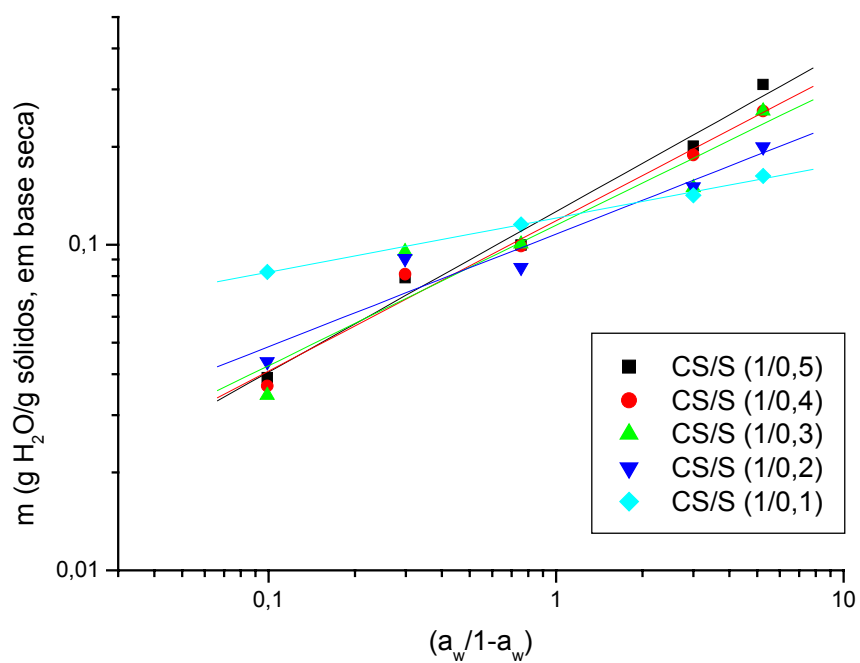


Figura 19 – Gráfico para obtenção dos parâmetros do modelo de Oswin.

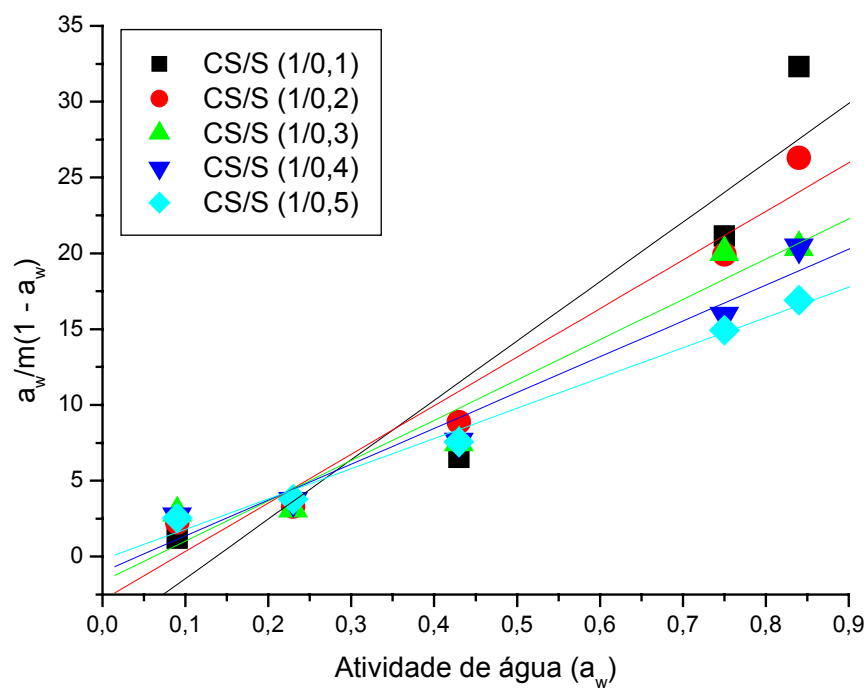


Figura 20 – Gráfico para obtenção dos parâmetros da equação de BET.

Em relação ao modelo de OSWIN, apesar dos parâmetros k e c não terem significados físicos práticos, este pode ser utilizado para descrever e prever a relação entre o conteúdo de umidade (base seca) e a atividade de água para os filmes de caseinato de sódio/sorbitol. Com isto é possível a partir de teor umidade prever o comportamento da atividade de água no filme ou vice-versa, que pode ser muito útil na formulação dos filmes e na sua funcionalidade.

O modelo de BET, em seu princípio original mostra que alguns significados físicos podem ser deduzidos a partir de seus parâmetros como m_1 , ou seja o conteúdo de umidade da monocamada e o parâmetro “ C ” que descreve o calor de sorção, no entanto devido à natureza complexa da composição dos alimentos, especialmente os derivados de proteínas, é mais fácil analisa-los como parâmetros empíricos.

Tabela 4 – Parâmetros estimados para os modelos selecionados das equações de isoterma de sorção para filmes de caseinato de sódio plastificados com diferentes teores de sorbitol.

Equação	Filmes CS/S	Intervalo de a_w	Constantes				Coeficiente de regressão linear (R)
			m_1	c	k	b	
BET	1/0,1	0,09-0,84	0,0296	-6,295	-	-	0,94451
	1/0,2	0,09-0,84	0,034	-10,157	-	-	0,98048
	1/0,3	0,09-0,84	0,040	-15,216	-	-	0,97608
	1/0,4	0,09-0,84	0,044	-22,590	-	-	0,98231
	1/0,5	0,09-0,84	0,0506	-100,47	-	-	0,99384
OSWIN	1/0,1	0,09-0,84	-	-	0,121	0,167	0,99826
	1/0,2	0,09-0,84	-	-	0,108	0,346	0,96529
	1/0,3	0,09-0,84	-	-	0,115	0,431	0,95145
	1/0,4	0,09-0,84	-	-	0,118	0,461	0,98997
	1/0,5	0,09-0,84	-	-	0,126	0,493	0,99243

O que deve ser salientado da análise dos parâmetros obtidos a partir da equação de BET é que os valores do conteúdo de umidade da monocamada (m_1) aumentaram com o aumento do conteúdo de sorbitol nos filmes de caseinato de sódio. Além disso, os valores do conteúdo de umidade da monocamada (m_1) foram sempre inferiores a 0,1 g/g matéria seca, que foi o valor máximo relatado para materiais alimentícios⁷³.

A ligação de água às proteínas é um resultado de numerosas interações moleculares e intermoleculares devido aos grupos hidrofílicos, hidrofóbicos e ionizáveis presentes na estrutura protéica. De acordo com Towns⁷⁴ a isoterma de sorção/desorção para as proteínas pode ser separada em três regiões. A primeira região é a de ligação da água a sítios altamente ativos tais como grupos carregados eletricamente ou altamente polares. A segunda região é de transição de cobertura de monocamada para multicamadas de moléculas de água. Ocorre com a ligação da água a sítios de sorção fracos tais como a cadeia peptídica e superfície de grupos polares. A ligação adicional de moléculas de água é via aglomerados em ou próxima a grupos altamente polares ou carregados e pelo preenchimento de cavidades criadas pelo intumescimento da proteína. A última região, ou região de multicamada ocorre pela condensação de água a sítios de ligação muito fracos.

A água adsorvida pode atuar como plastificante, resultando em um aumento do volume livre e maior mobilidade macroscópica. Durante a hidratação do filme, as moléculas de água adsorvidas pelo filme podem levar ao desenvolvimento de ligações de hidrogênio entre a água-proteína, reduzindo as interações intercadeias e fortalecendo a mobilidade do filme. Como consequência disto foram observadas alterações nas propriedades mecânicas dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol mantendo-se a mesma concentração de plastificante, porém alterando-se o teor de umidade relativa da atmosfera de acondicionamento dos filmes. Isto nos permite concluir que não somente o sorbitol atua como plastificante, mas também a água. O papel plastificante da água e sua influência nas propriedades mecânicas são discutidos na seção 3.8.

3.7 Caracterização da Temperatura de Transição Vítea

A característica mais importante que distingue as proteínas de outras macromoléculas é sua grande variedade de estruturas conformacionais, reflexo da

diversidade de aminoácidos formadores das proteínas (estrutura primária). Dentro das estruturas secundárias que as proteínas podem assumir, poucas são predominantemente na forma helicoidal, como o colágeno, ou preferencialmente de conformação aleatório como a elastina. A maioria das proteínas é constituída por uma mistura de várias estruturas secundárias como α -hélice, β -pregueada e aleatória. A mobilidade e a capacidade de interações com outras moléculas, dependem destas estruturas.

Assim, quanto mais estável a estrutura, maior a barreira energética para os movimentos intramoleculares. Em muitos casos pode ocorrer decomposição térmica antes das cadeias adquirirem mobilidade e atingir a temperatura de transição vítrea. Na temperatura de transição vítrea (T_g) o coeficiente de expansão linear (α) muda abruptamente, apresentando valores diferentes abaixo e acima da T_g . A extrapolação das curvas de expansão térmica permite determinar a T_g ⁷⁵.

Conforme mostrado pela Figura 21 a T_g para os filmes de caseinato de sódio foi de 198°C, um valor maior ao calculado teoricamente por Kalichevsky e colaboradores¹⁸ para a caseína e caseinato de sódio desidratado (144°C e 130°C, respectivamente), obtidos pela extrapolação para concentração zero de plastificante (frutose e água) através da equação de Gordon-Taylor [Equação 3]. Macromoléculas, como a proteína do glúten de trigo (T_g = 162°C), amilopectina (T_g = 227°C) e zeína (188°C) [30], apresentam valores de temperatura de transição vítrea de mesma magnitude daquela encontrada para o caseinato de sódio.

De acordo com os dados da Figura 22 o sorbitol exerce um efeito depressor na temperatura de transição vítrea dos filmes, pois a T_g diminui com o aumento da concentração de sorbitol nos filmes. A Tabela 5 resume os dados de temperatura de transição vítrea e do coeficiente de expansão térmica linear para os filmes aqui estudados.

O coeficiente de expansão térmica linear (α_2) diminui com o aumento da proporção de plastificante (sorbitol) no filme de caseinato de sódio, provavelmente devido a presença de uma estrutura caseinato/sorbitol mais expandida nos filmes com maior proporção de plastificante. Esta característica concorda com um menor valor para a T_g em relação ao filme com CS/S (1/0,1). O filme de CS puro apresentou um menor valor para α_2 provavelmente devido a presença de fortes interações intramoleculares.

Tabela 5 – Temperatura de transição vítrea (T_g) e coeficiente de expansão térmica linear (α) de filmes de caseinato de sódio e caseinato de sódio/sorbitol.

Composição	$\alpha_1 (^{\circ}\text{C}^{-1}).10^4$	$\alpha_2 (^{\circ}\text{C}^{-1}).10^2$	$T_g (^{\circ}\text{C})$
CS	0,84	0,25	198
CS/S (1/0,1)	0,14	3,78	180
CS/S (1/0,2)	3,66	2,27	157
CS/S (1/0,3)	7,99	1,81	143
CS/S (1/0,4)	7,09	1,25	130
CS/S (1/0,5)	5,36	0,85	114

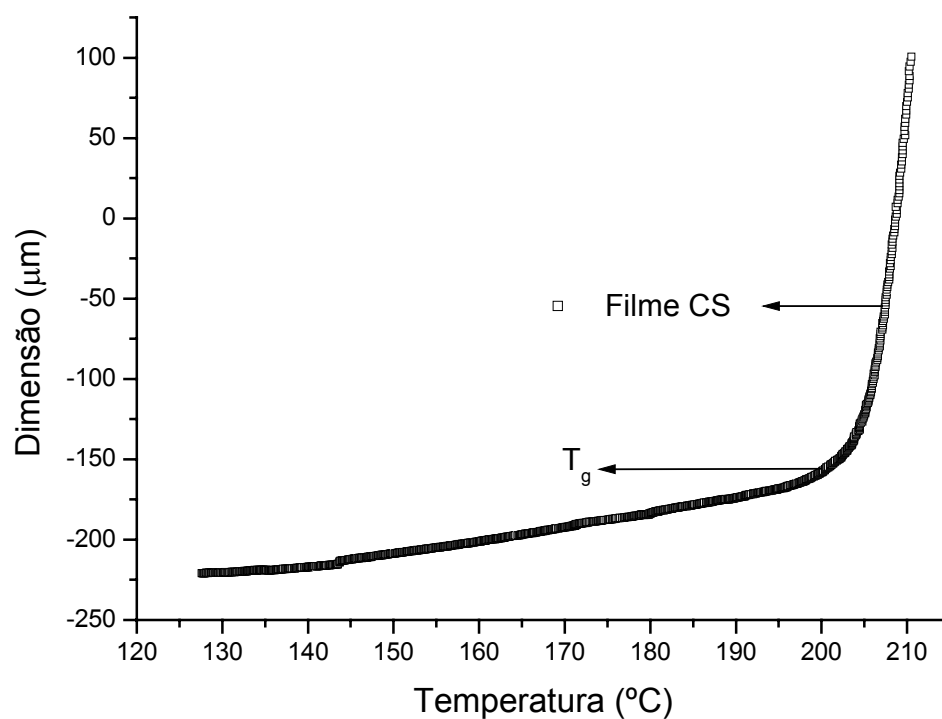


Figura 21 – Curva de TMA para filme de caseinato de sódio.

O modelo de Gordon-Taylor (Eq.3) apresentou uma melhor correlação linear do que o modelo de Fox (Eq.2), demonstrando uma melhor descrição das características do sistema caseinato de sódio/sorbitol, conforme pode ser visualizado na Figura 23.

O valor da constante k (Eq. 3) obtido foi de 0,72, que deve ser relacionado como um índice de interação proteína-plastificante (quanto menor o k maior o efeito plastificante). Este valor é próximo ao observado por Kalichevsky e colaboradores¹⁸ para o sistema CS/água ($k=0,76$), no entanto é maior que os reportados pelo mesmo autor para o glúten e amilopectina plastificados por água (0,20 e 0,22, respectivamente). Provavelmente o valor de k (Eq. 3) determinado no presente estudo deve-se a marcante característica hidrofóbica da molécula de caseína e de seu derivado sódico.

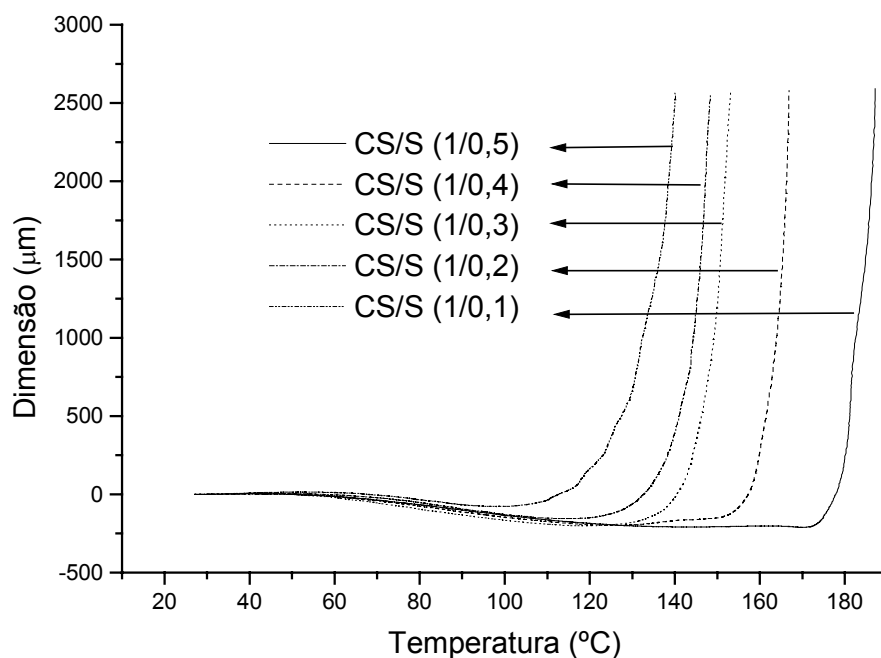


Figura 22 – Curvas de TMA para filmes de caseinato de sódio/sorbitol.

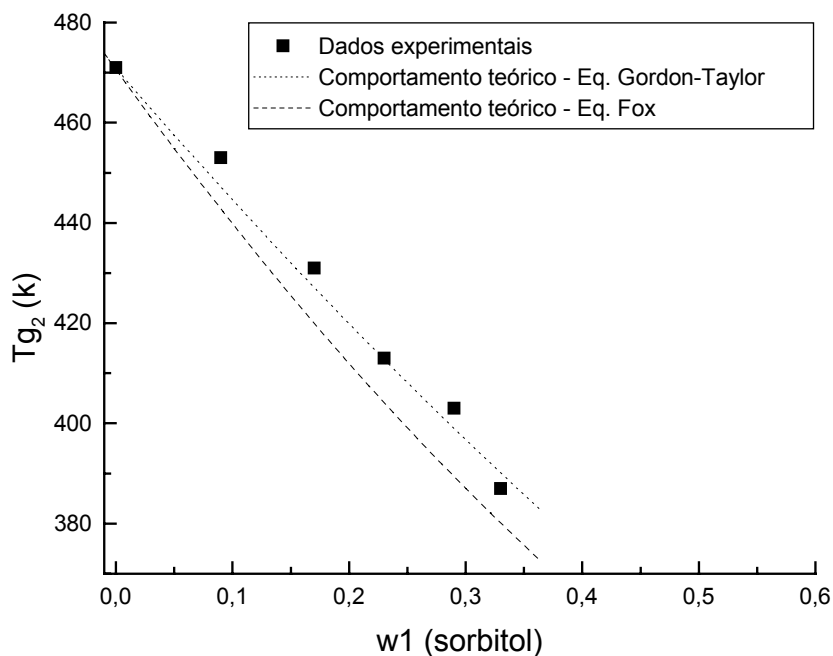


Figura 23 – Comparação dos modelos de Fox e de Gordon-Taylor aplicados aos filmes de caseinato de sódio e caseinato de sódio/sorbitol, em função do conteúdo de sorbitol (w_1).

3.8 Propriedades Mecânicas

O papel primário de um plastificante é melhorar a flexibilidade do filme e diminuir sua fragilidade. A adição de plastificantes leva a uma diminuição das forças intermoleculares ao longo da cadeia polimérica a qual acarreta um aumento da flexibilidade e também torna o filme mais fácil de se destacar de seu suporte após o espalhamento da solução formadora do filme².

Os dados de módulo de Young, tensão máxima ou tensão de ruptura e deformação na ruptura podem ser utilizados para relacionar estas propriedades mecânicas com a estrutura química presente nos filmes poliméricos. Os resultados de tensão máxima e tensão de ruptura são quase idênticos, por esta razão somente o primeiro será aqui apresentado, embora sejam conceitualmente diferentes.

Plastificantes como o sorbitol e a água tornam os filmes mais flexíveis, porém a eficiência plastificante de cada um depende muito da concentração. Assim, as propriedades

mecânicas de filmes de caseinato de sódio foram comparadas em função do conteúdo destes dois compostos plastificantes.

A Figura 24 mostra as curvas típicas de tensão vs. deformação para o sistema CS/S (1/0,4) a várias umidades relativas do ar de acondicionamento (A) e para o sistema CS/S (1/0,5) também a várias umidades (B).

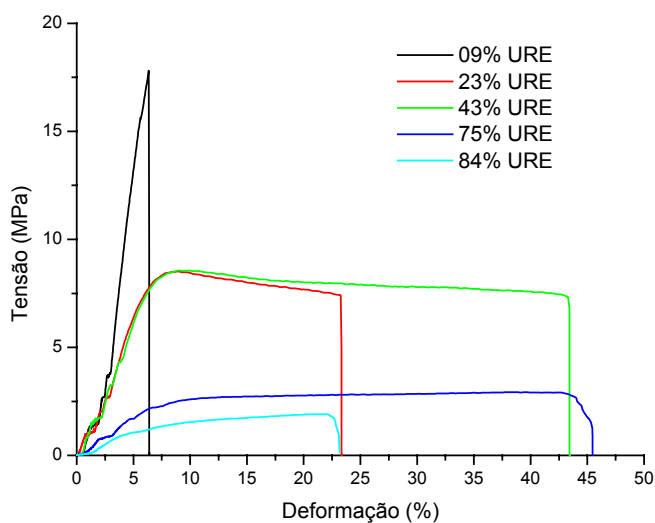
Ambos os plastificantes, sorbitol e água, tornam os filmes mais flexíveis, conforme se observa a partir da Figura 24. Numa mesma umidade relativa do ar, o filme mais flexível é aquele que possui um maior teor de plastificante. Por outro lado, com o mesmo teor de plastificante, o filme mais flexível é aquele que foi mantido em uma atmosfera com maior umidade relativa do ar.

Os dados das propriedades mecânicas, como módulo de Young, deformação na ruptura e tensão máxima são apresentados nas Figuras 25, 26 e 27.

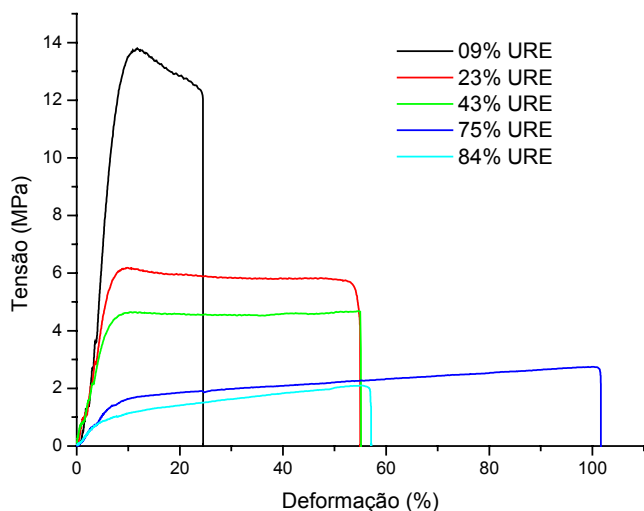
Os filmes formulados sem a presença de sorbitol como plastificante eram muito quebradiços o que dificultava a manipulação para a efetuação dos ensaios mecânicos. Por outro lado, os filmes formulados com um conteúdo de plastificante acima de 50% (g/g de caseinato de sódio) eram muito aderentes o que também dificultava a realização dos ensaios mecânicos.

Os filmes foram também avaliados após terem sido mantidos a diferentes condições de umidade relativa do ar (URE) ambiente, isto é, a 9%; 23%; 43%; 75% e 84%, já que é sabido que a água atua, também, como plastificante em filmes poliméricos².

Em relação ao módulo de Young calculado a partir dos ensaios mecânicos, os filmes de caseinato de sódio/sorbitol na razão 1/0,2, independente do conteúdo de umidade presente, devido ao equilíbrio após serem mantidos a diferentes condições de URE, foram os que sempre apresentaram os maiores valores. Estes filmes (CS/S – 1/0,2) apresentaram, por exemplo, um valor máximo de 1.051 MPa a 9% de URE e um valor mínimo de 70 MPa para uma umidade relativa do ambiente de 84%, com uma grande magnitude de variação, alcançando a ordem de 981 MPa.



(A)



(B)

Figura 24 – Curvas típicas de tensão vs. deformação de filmes (A) CS/S (1/0,4) e (B) CS/S (1/0,5).

Estes resultados são um indicativo que a presença de sorbitol em uma razão igual ou inferior a 20% (g/g de caseinato de sódio) tornam os filmes rígidos e frágeis, mas ainda mostram propriedades mecânicas aceitáveis. No entanto, as melhores propriedades mecânicas parecem ocorrer nos filmes com mais de 20% (p/p) de caseinato de sódio.

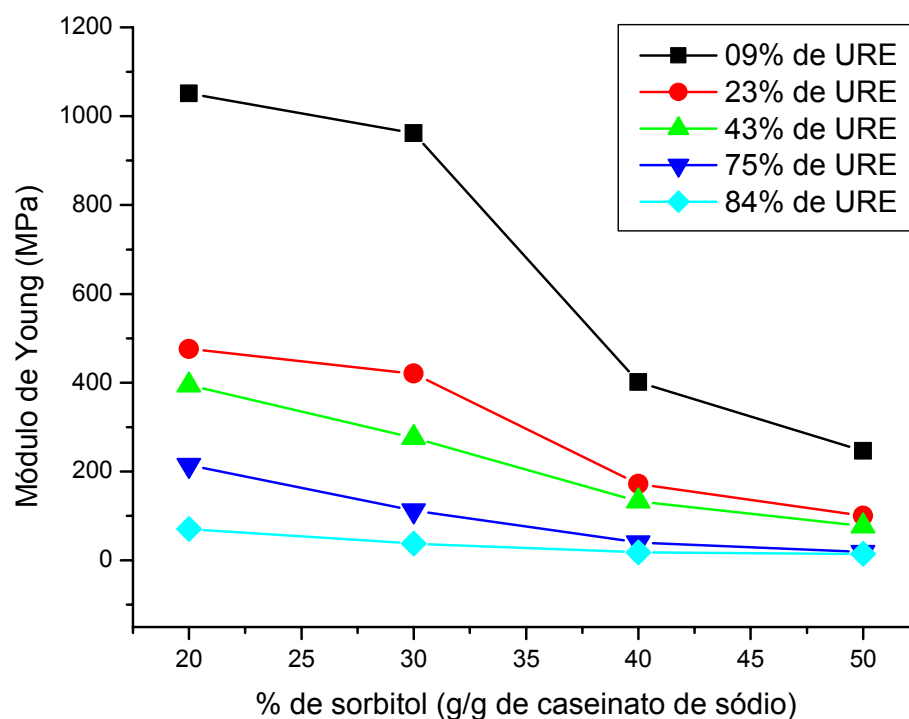


Figura 25 – Média dos valores do módulo de Young para os filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol e mantidos a diferentes umidades relativas do ar.

Os demais sistemas apresentaram uma dependência dos valores do módulo de Young tanto com o teor de plastificante (sorbitol) como com a umidade relativa ambiente de estocagem do filme, como mostrado na Figura 25. Isto é, à medida que a concentração de sorbitol aumenta, ocorre um decréscimo nos valores do módulo de Young, decréscimo que também acontece com um aumento da umidade relativa do ambiente. A Tabela 6 resume os dados do módulo de Young, tensão máxima e deformação na ruptura dos filmes formulados com diversas concentrações de plastificante (sorbitol) e acondicionados a várias umidades relativas do ambiente, bem como apresenta a análise estatística de variância dos diversos sistemas.

Tabela 6 – Propriedades mecânicas de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol.

Filme	Condições de URE	Módulo de Young (MPa) ± desvio padrão	Tensão Máxima (MPa) ± desvio padrão	Deformação na Ruptura (%) ± desvio padrão
CS/S (1/0,2)	09%	1051,1 ± 178 ^a	44,8 ± 7,4 ^a	6,0 ± 1,2 ^a
	23%	476,2 ± 100,7 ^b	28,1 ± 2 ^b	13,7 ± 5,4 ^b
	43%	394,4 ± 168,7 ^{b,c}	26,7 ± 3 ^{b,c}	15,1 ± 6,3 ^b
	75%	214,6 ± 77,3 ^d	11,6 ± 1,4 ^d	15,2 ± 6,9 ^b
	84%	70,6 ± 62,7 ^e	7,6 ± 1,7 ^e	25,2 ± 7,8 ^c
CS/S (1/0,3)	09%	961,6 ± 167,9 ^a	35,4 ± 9,5 ^a	7,6 ± 1,7 ^a
	23%	421 ± 114,2 ^b	22,7 ± 1,1 ^b	22,9 ± 7,1 ^b
	43%	276 ± 74,6 ^c	15,9 ± 1,5 ^c	37,5 ± 8,4 ^c
	75%	112,3 ± 65,4 ^d	9,2 ± 1 ^d	28,1 ± 10,6 ^{b,c,d}
	84%	37,6 ± 18,4 ^e	5,3 ± 1,4 ^e	27,9 ± 5,7 ^{b,d,e}
CS/S (1/0,4)	09%	401,4 ± 28,7 ^a	16,1 ± 2,7 ^a	6,3 ± 1,1 ^a
	23%	171,7 ± 19,1 ^b	9,2 ± 0,8 ^b	23 ± 9,7 ^b
	43%	132,9 ± 11,2 ^c	8 ± 0,5 ^c	32,7 ± 11,9 ^c
	75%	40,5 ± 8,8 ^d	3,1 ± 0,5 ^d	37,2 ± 10,4 ^c
	84%	17,7 ± 6 ^e	2,2 ± 0,5 ^e	18,4 ± 4,8 ^{b,d}
CS/S (1/0,5)	09%	246,2 ± 29,9 ^a	13,7 ± 2,2 ^a	18,4 ± 8,6 ^a
	23%	99,9 ± 8,2 ^b	6,2 ± 0,3 ^b	61,7 ± 17,6 ^b
	43%	77,1 ± 9,9 ^c	4,9 ± 0,3 ^c	58,2 ± 18,4 ^b
	75%	19 ± 4,3 ^d	2,8 ± 0,5 ^d	86,6 ± 17,5 ^c
	84%	14,3 ± 5,7 ^e	1,8 ± 0,5 ^e	49,4 ± 13,6 ^{b,d}

Onde: letras diferentes dentro das células referentes aos sistemas com uma mesma concentração de plastificante denotam diferença significativa ($p < 0,05$).

Como observado na Tabela 6, os valores do módulo de Young são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para as formulações contendo 20%, 30%, 40% e 50% (g/g de caseinato de sódio), mesmo quando mantidos em atmosfera com diferentes umidades relativas do ar. Alterações similares nas propriedades mecânicas provocadas por plastificantes hidrofílicos foram também observadas previamente para vários filmes de proteínas e polissacarídeos^{42,76,77}.

Na Tabela 7 são comparados valores de módulo de Young de diferentes filmes protéicos descritos na literatura com os obtidos no presente estudo. Percebe-se claramente a influência da água como plastificante nos valores do módulo de elasticidade. Outro fator a se ressaltar é o valor do pH, onde filmes protéicos preparados em pH afastado do ponto isoelétrico, tendem a terem suas cadeias mais afastadas devido à repulsão eletrostática, bem

como a presença de um número maior de sítios hidrofílicos de ligação tanto com o plastificante como com a água.

Tabela 7 – Comparação dos valores de módulo de Young de filmes de proteínas de diversos estudos publicados.

Módulo de Young (MPa)	Filme	URE (%)	pH	Referência
78 ± 3	Isolado de proteínas do soro do leite/sorbitol	50	7	39
64 ± 2	Isolado de proteínas do soro do leite /sorbitol	50	9	39
62 ± 3	β -caseína/glicerol	50		28
102	Isolado de proteínas do soro do leite/glicerol	58	4	48
88	Isolado de proteínas do soro do leite/glicerol	58	6	48
$23,8 \pm 2,4$	Amido de milho/água (85/15)			24
$22,0 \pm 0,4$	Amido de milho/caseinato de sódio (1/1)			24
$1051,1 \pm 178$	Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,2)	09	6,5	Presente estudo
$14,3 \pm 5,7$	Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,5)	84	6,5	Presente estudo
$77,1 \pm 9,9$	Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,5)	43	6,5	Presente estudo

A tensão máxima (MPa) dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol a diferentes umidades relativas do ar é mostrada na Tabela 6 e Figura 26. Os valores atingiram um máximo de $44,8 \pm 7,4$ MPa para o sistema caseinato de sódio/sorbitol (CS/S - 1/0,2) acondicionado durante 14 dias a 9% de URE e um mínimo de $1,8 \pm 0,5$ MPa para o sistema CS/S (1/0,5) mantido durante o mesmo período a 84% de umidade relativa do ar.

Os valores de tensão máxima apresentaram um comportamento similar ao mostrado para os valores do módulo de elasticidade, ou seja, a tensão máxima diminuiu com o aumento do teor de plastificante (sorbitol) nos filmes, bem como houve uma diminuição nos valores da tensão máxima com o aumento da umidade relativa do ar de acondicionamento dos filmes, apresentando ainda uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sistemas mantidos a diferentes umidades relativas do ambiente. Este comportamento concorda com o discutido anteriormente para os valores do módulo de

Young, ou seja, o efetivo poder plastificante tanto do sorbitol como também da água em filmes de caseinato de sódio.

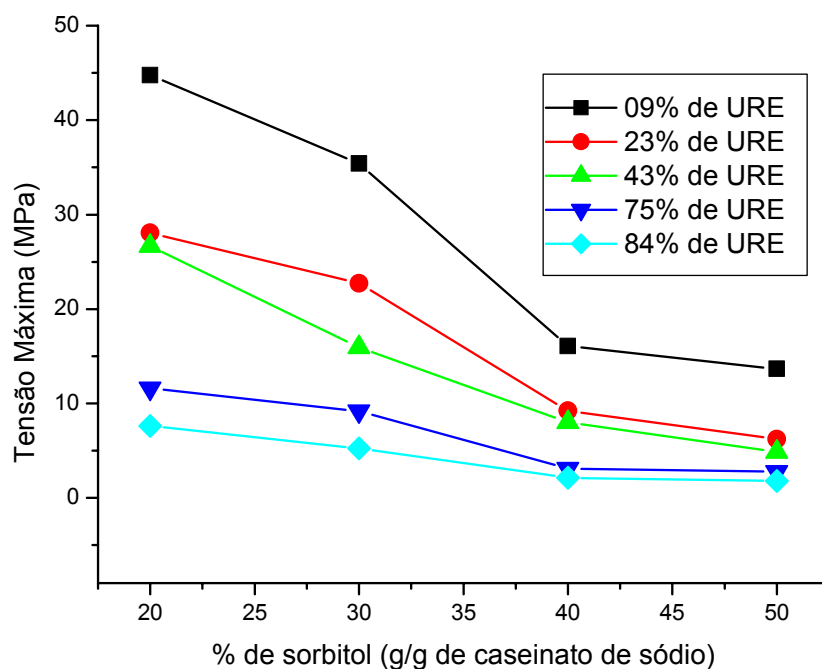


Figura 26 – Tensão máxima dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol a diversas umidades relativas do ar.

A Figura 27 apresenta o comportamento da deformação na ruptura dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol e acondicionados a diferentes umidades relativas do ar. Os filmes de caseinato de sódio/sorbitol (1/0,2), não importando o teor de umidade da atmosfera em que foram mantidos os filmes (14 dias) foram os que apresentaram sempre a menor deformação na ruptura. Já os filmes que apresentaram um maior valor de deformação na ruptura foram os filmes mantidos em uma atmosfera de 75% de URE, superando os filmes mantidos a 84% de URE. Isto pode ser explicado pelo fato de que os filmes mantidos nestas condições estavam mais fragilizados pelo poder plastificante da água.

A Tabela 8 apresenta uma comparação dos valores das propriedades de tensão máxima (MPa) e deformação na ruptura de filmes estudados no presente trabalho e outros da literatura.

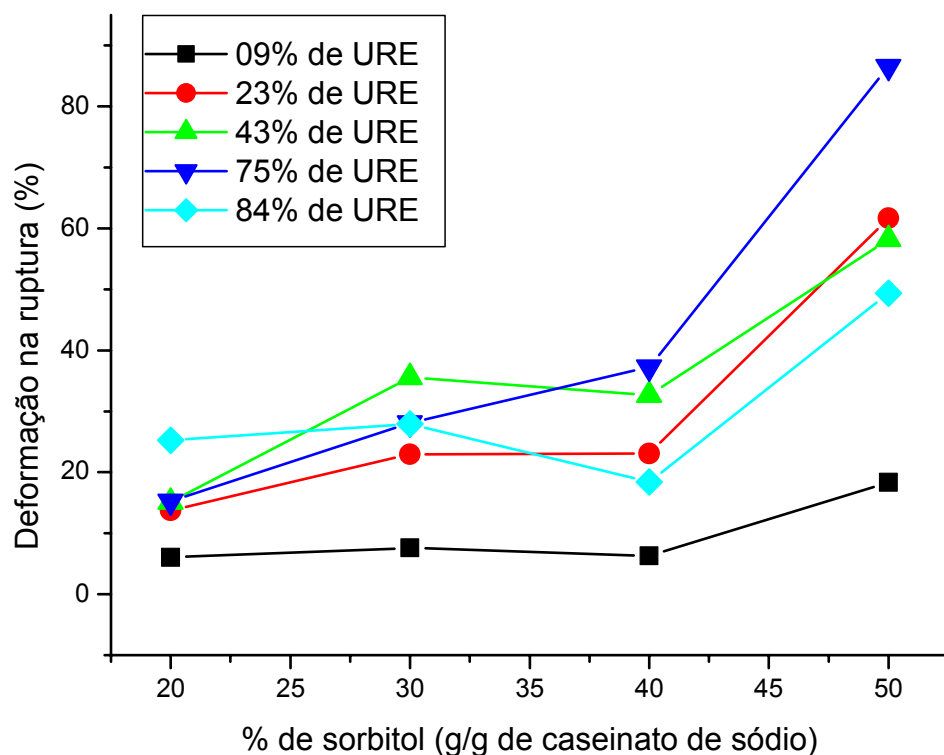


Figura 27 – Deformação na ruptura dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol e mantidos a diferentes atmosferas de umidade relativa do ar.

A efetividade das interações entre o plastificante e a proteína (caseinato de sódio) é um importante fator na determinação das propriedades físicas dos filmes. Idéias similares foram levantadas na literatura para explicar as diferenças entre diversos filmes de biopolímeros. A habilidade do plastificante em alterar as propriedades físicas do filme depende largamente da compatibilidade entre o material plastificante e a proteína.

Tabela 8 – Comparação de valores de tensão máxima e deformação na ruptura de vários filmes.

Tensão Máxima (Mpa)	Elongação (%)	Filme	URE (%) ^a Umidade (%) ^b	pH	Referência
12,6 ± 1,1	10,6 ± 1,1	Amido/metilcelulose (50/40)	10 ^b		29
4,2 ± 0,4	89,0 ± 18,9	Glúten/glicerina (15/6 – p/p)	50 ^a		36
5,7 ± 0,2	57,2 ± 4,4	Glúten/glicerina/sorbitol (15/3/3 – p/p))	50 ^a		36
4,27 ± 0,5	26,4 ± 0,5	Clara do ovo/Peg400 (1/0,6)	50 ^a	10,5	34
5,13 ± 0,85	40,6 ± 4,8	Clara do ovo/Peg400 (1/0,6)	50 ^a	11,5	34
22,0 ± 0,4	30,2 ± 2,6	Amido de milho/caseinato de sódio (1/1 – p/p)	5 ^b		24
55,62 ± 2,12	11,6 ± 4,90	Metilcelulose	50 ^a		11
14,79 ± 1,08	32,76 ± 4,8	Hidroxipropilcelulose	50 ^a		11
2,9 ± 0,1	40 ± 4	Isolado de proteínas do soro do leite/sorbitol	50 ^a	7	39
2,9 ± 0,1	64 ± 2	Isolado de proteínas do soro do leite /sorbitol	50 ^a	9	39
6,0 ± 1,1	246 ± 29	β-caseína/glicerol	50 ^a		28
17,4 – 26,7	10,5	Caseinato de sódio/glicerol (4/1 – p/p)	50 ^a		23
10,9 – 16,35	5,3	Caseinato de sódio/PEG400 (4,54/1 – p/p)	50 ^a		23
10,9 – 13,9	25,4	Caseinato de sódio/PEG400 (1,9/1 – p/p)	50 ^a		23
44,8 ± 7,4	6,0 ± 1,2	Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,2)	09 ^a	6,5	Presente estudo
1,8 ± 0,5	49,4 ± 13,6	Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,5)	84 ^a	6,5	Presente estudo
13	500	Polietileno de baixa densidade (LDPE)	50 ^a		23
26	300	Polietileno de alta densidade (HDPE)	50 ^a		23

Os valores comparativos apresentados nas Tabelas 7 e 8 indicam que os valores encontrados no presente estudo das propriedades mecânicas (Tabela 6) são da mesma ordem de grandeza de outros filmes biopoliméricos como também de filmes sintéticos (LDPE e HDPE). Dependendo das condições de estudo, os valores encontrados para os filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol, como por exemplo, para a tensão máxima, são maiores do que os valores apresentados tanto para o LDPE como para o HDPE, ilustrando a susceptibilidade dos filmes de caseinato de sódio em terem aplicação prática como embalagem de alimentos.

Pode-se concluir que as alterações nas propriedades mecânicas caracterizam modificações na organização tridimensional, diminuem a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares que ocorrem na rede de proteínas que forma o filme. O sorbitol é uma molécula hidrofílica, de baixa massa molar, com um esqueleto de seis carbonos e grupos hidroxilas que, pode facilmente se interpor entre as cadeias de proteínas alterando o perfil de hidratação das moléculas protéicas e das interações proteína-proteína, levando à alterações nas propriedades mecânicas dos mesmos.

Além disso, as propriedades mecânicas foram afetadas pelo aumento da umidade relativa da atmosfera de manutenção dos filmes. Como a molécula protéica de caseinato de sódio apresenta caracter hidrofílico, as interações da água com a proteína e conseqüentemente o teor de água nos filmes foram considerados para explicar as modificações nas propriedades mecânicas. Ou seja, quando a umidade relativa aumentava, a fração de água adsorvida induzia um efeito plastificante clássico, caracterizado por um aumento da deformação de ruptura e uma diminuição da tensão máxima e do módulo de Young.

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) possui uma grande profundidade de foco, alta resolução e permite que as amostras de filmes poliméricos sejam examinadas em seu estado original ⁷⁸.

Para ajudar a elucidar possíveis diferenças estruturais nos filmes de caseinato de sódio sem e com adição de plastificante (sorbitol), a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada em filmes de caseinato de sódio. As micrografias (Figuras 28, 29 e 30.) mostram

que não existem alterações significativas na morfologia dos filmes, por este motivo são apresentados apenas as de melhor resolução de imagem.

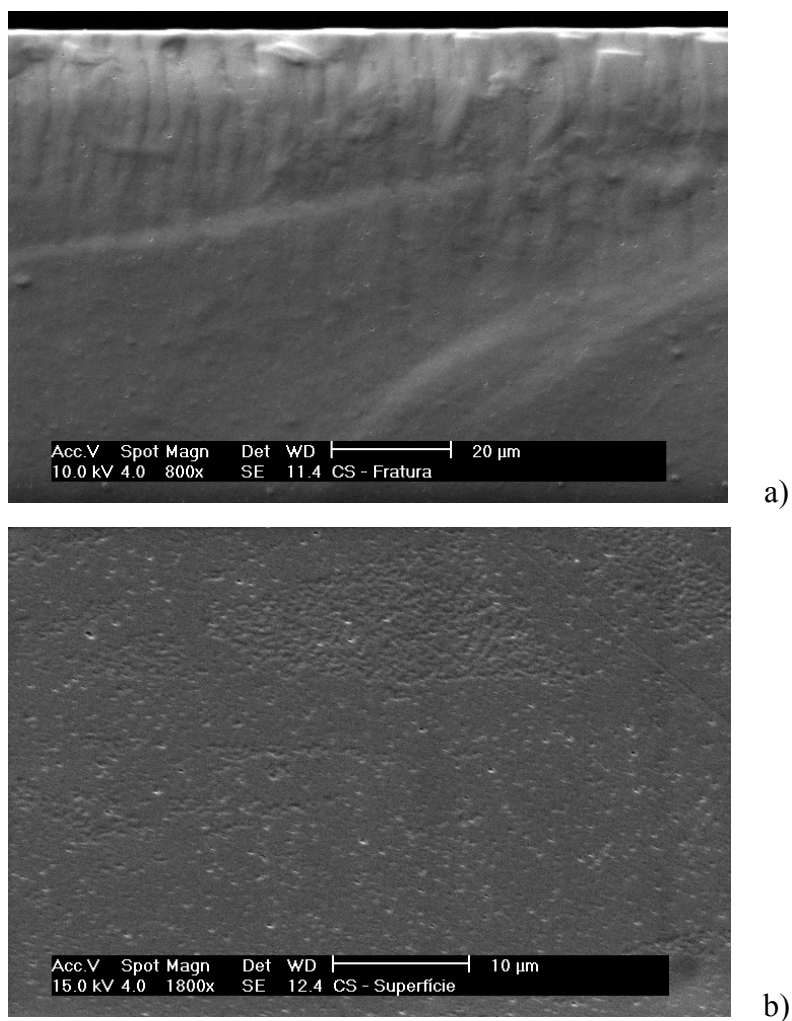
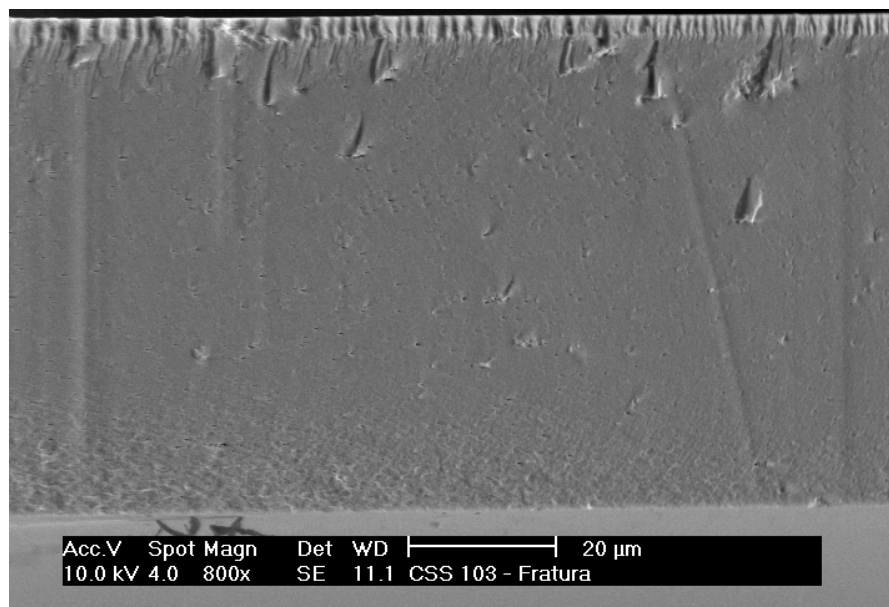
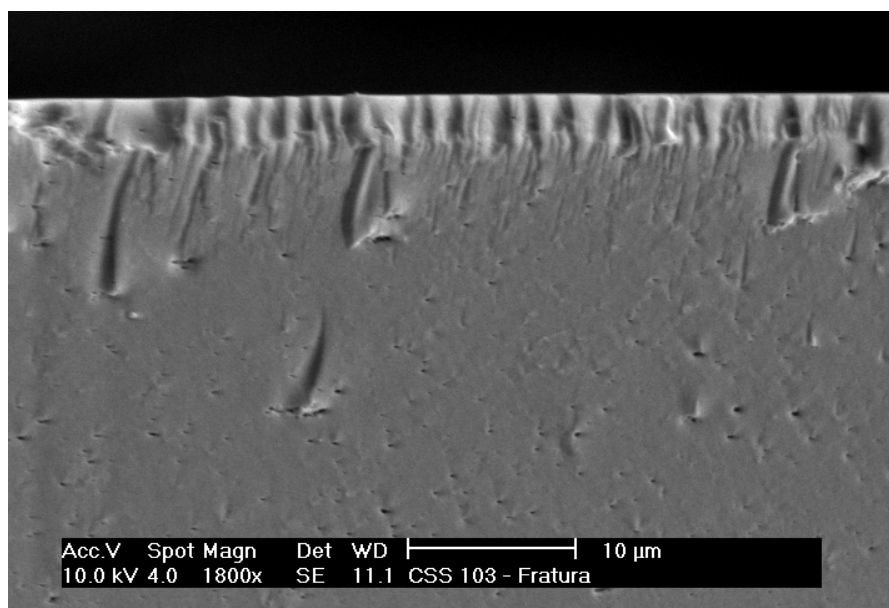


Figura 28 – Micrografia utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) de a) seção transversal, e b) superfície de filme de caseinato de sódio.



a)

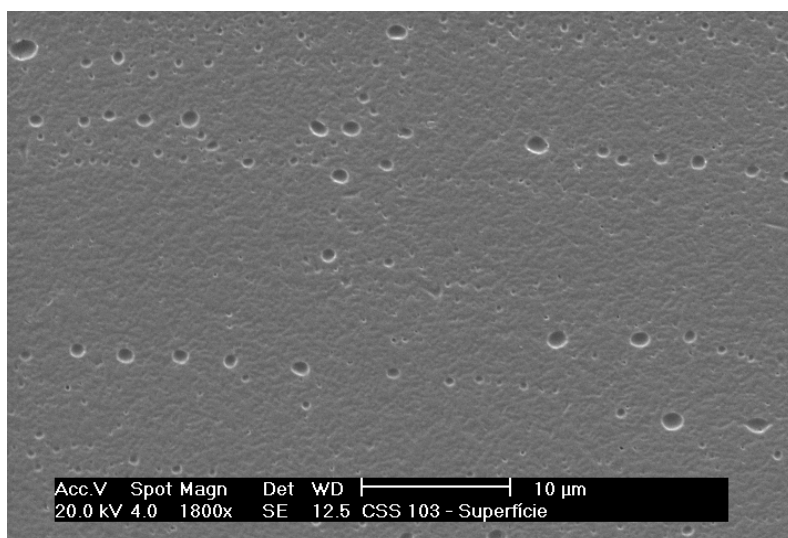


b)

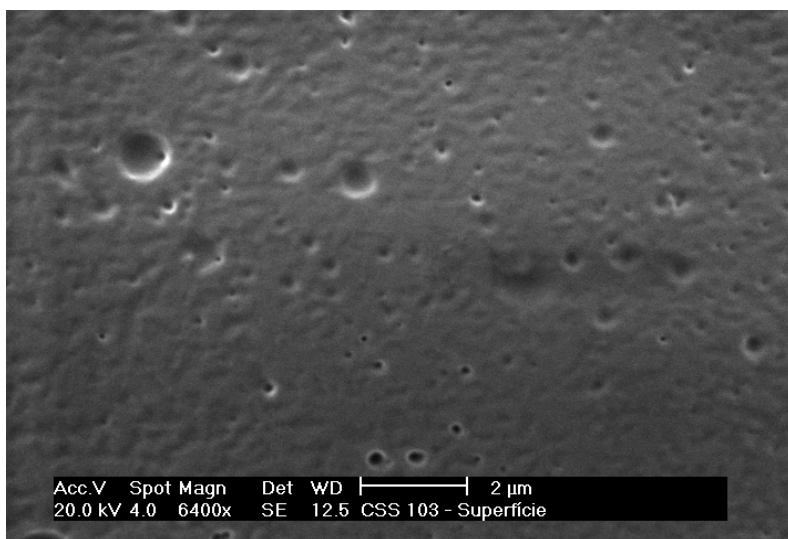
Figura 29 - Micrografia de microscópio eletrônico de varredura (MEV) da seção transversal de filme da caseinato de sódio plastificado com sorbitol (30 % g/g de caseinato de sódio).

Os filmes apresentam-se como uma camada lisa, densa e compacta. Não se verifica a presença de poros na superfície e na seção transversal dos filmes, mesmo com adição de plastificante. Na superfície do filmes observa-se uma depressões ou crateras, possivelmente

motivado pela evaporação do solvente (água) durante a formação do filme. A estrutura densa dos filmes deve-se ao empacotamento e agregação das moléculas protéicas de caseinato de sódio durante a evaporação do solvente (água).



a)



b)

Figura 30 - Micrografia de microscópio eletrônico de varredura da superfície de filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (30% g/g de caseinato de sódio).

Existe uma pequena diferença entre as bordas da seção transversal, provocada pela posição das faces do filme durante a evaporação do solvente, ou seja, uma face voltada para o meio externo e outra voltada para a superfície da placa de poliestireno que funciona como

suporte. Este fenômeno foi também observado por Mauer e colaboradores²⁸ ao analisarem filmes de β -caseína, o qual foi atribuída à taxa de evaporação do solvente e migração do plastificante (no caso, glicerol) durante a secagem da solução formadora do filme.

3.10 Estabilidade térmica dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol (CS/S)

Considerando a possibilidade de utilizar os filmes biopoliméricos como cobertura, envoltório ou como embalagem de alimentos, e que os mesmos podem ser submetidos a processos térmicos durante a preparação, processamento ou mesmo no consumo é que foram conduzidas pesquisas das propriedades térmicas e de estabilidade para sua aplicação racional nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

A análise termogravimétrica (TGA) é a ferramenta de escolha para avaliar a estabilidade e propriedades térmicas, pois pode-se medir a variação de massa de uma amostra em função da temperatura e/ou do tempo. A análise termogravimétrica foi usada para calcular a cinética de degradação térmica dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol, incluindo parâmetros como energia de ativação aparente e fator pré-exponencial, utilizando-se o método de Ozawa. O mecanismo da degradação térmica foi analisado por espectroscopia de infravermelho, tanto do produto gasoso da decomposição térmica como do resíduo final.

As curvas termogravimétricas para filmes de caseinato de sódio e de caseinato de sódio plastificados com sorbitol são apresentadas na Figura 31.

Deve-se salientar que os demais sistemas (10%, 30% e 50% g sorbitol / g caseinato de sódio) não são apresentados na Figura 31 para que se possa obter uma melhor visualização das características de cada curva. Ambos os sistemas apresentam um comportamento semelhante com dois estágios principais de perda de massa. O primeiro estágio, observado até cerca de 200°C, está relacionado com a perda de água adsorvida e água ligada e não foi considerado para a determinação dos parâmetros cinéticos. O segundo estágio de perda de massa, o qual está associado com a degradação do filme, foi analisado em maior detalhe para se determinar os parâmetros cinéticos dos filmes com ou sem a presença de plastificante.

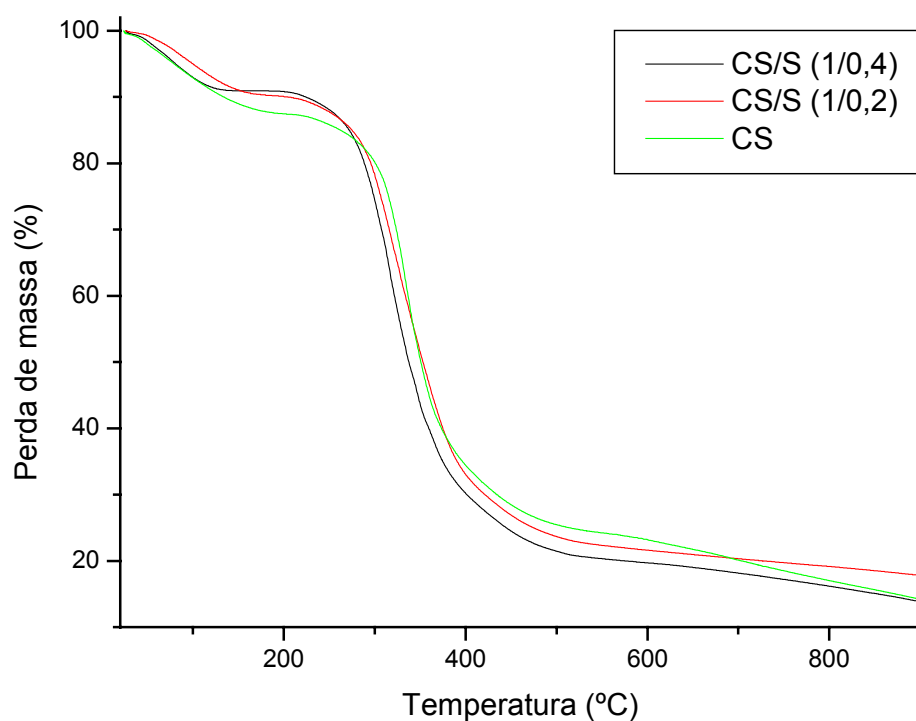


Figura 31 – Curvas termogravimétricas para filmes de caseinato de sódio com e sem a adição de plastificante (sorbitol) a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

As temperaturas, de degradação inicial e máxima para os filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol, são apresentadas na Tabela 9.

A degradação do filme de caseinato de sódio puro inicia a aproximadamente 300°C e é sempre maior do que a temperatura inicial de degradação dos filmes com a presença de sorbitol. Conforme a Tabela 9 a temperatura de início da degradação térmica dos filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol varia entre 272 (CS/S – 1/0,03) até 299 (CS/S – 1/0,1), indicando uma diminuição na estabilidade térmica dos filmes plastificados.

Tabela 9 – Parâmetros termogravimétricos e cinéticos para filmes de caseinato de sódio com e sem adição de sorbitol.

Filme	T _i (°C)	T _{máx} (°C)	E* (kJ mol ⁻¹)	Resíduo (%)
CS	300	330	148,5	15
CS/S (1/0,1)	299	326	143,7	18
CS/S (1/0,2)	279	325	181,0	18
CS/S (1/0,3)	272	320	125,4	16
CS/S (1/0,4)	279	316	146,5	14
CS/S (1/0,5)	276	308	131,6	16

* valor médio conforme Figura 32

Esta diminuição da estabilidade térmica fica mais evidente quando se compara a temperatura de degradação máxima (Tabela 9). O filme de caseinato de sódio apresenta o maior valor para a temperatura de degradação máxima (330°C). Os filmes plastificados com sorbitol apresentam uma diminuição da temperatura de degradação máxima a medida que aumenta o conteúdo de sorbitol no filme de caseinato de sódio. Aparentemente, o sorbitol afeta as interações proteína-proteína, diminuindo em consequência a estabilidade térmica dos filmes. De acordo com Barreto e colaboradores⁷⁹, durante o aquecimento a estrutura ordenada inicial dos filmes é gradualmente destruída. Conforme Kaminska e Sionkowska⁸⁰, isto pode ser possível após a quebra das ligações de hidrogênio inter- e intramolecular as quais são responsáveis pela manutenção do ordenamento da matriz polimérica nos filmes protéicos.

Comportamento semelhante ao observado para os filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol foi também encontrado para filmes de proteínas do soro do leite e de gelatina⁷⁹, confirmando-se, aparentemente, um padrão de diminuição da estabilidade térmica em filmes formados a base de proteínas e plastificados com sorbitol.

Em relação à massa residual (%) após o aquecimento a 900°C, os valores situam-se entre 14-18% para todos os sistemas estudados. As similaridades nas massas residuais devem ser atribuídas à estrutura protéica idêntica presente em todos os filmes.

As energias de ativação aparente (E) para a degradação térmica dos sistemas estudados, foram determinadas utilizando-se o método de Ozawa^{81, 82}, versus a fração de perda de massa (α) e são apresentadas na Figura 32.

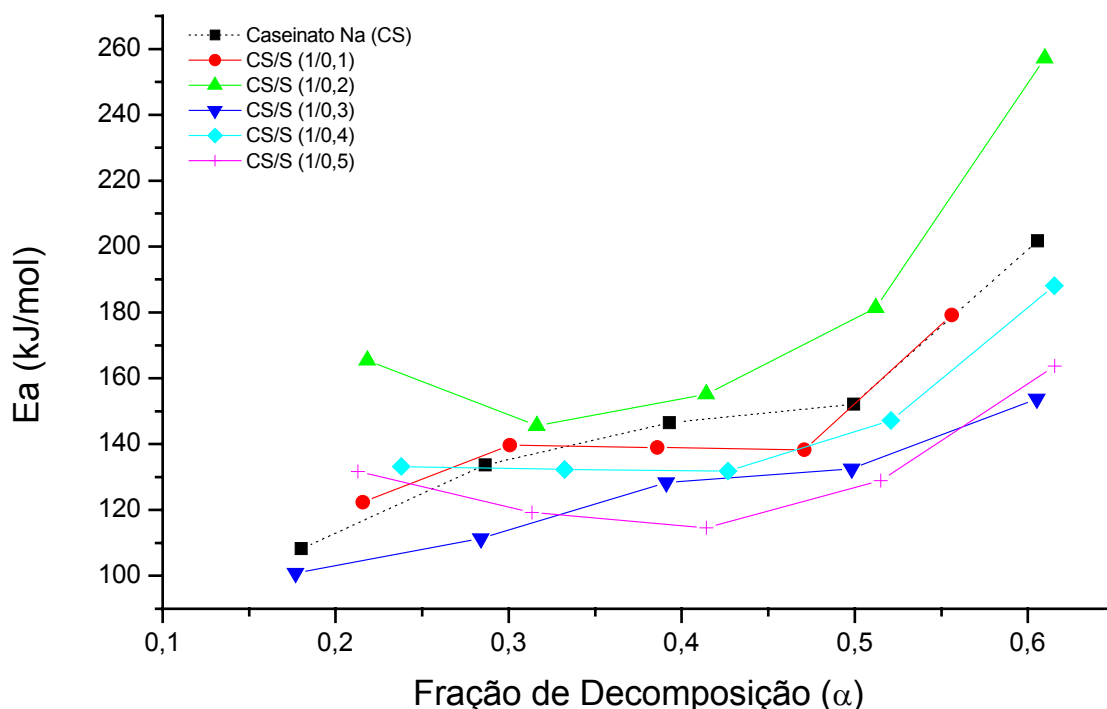


Figura 32 – Gráfico da energia de ativação *versus* a fração de perda de massa para os filmes de caseinato de sódio com e sem a adição de plastificante (sorbitol).

O sistema que apresentou uma maior variação na energia de ativação aparente (E) em relação à fração de perda de massa (α) foi o filme de caseinato de sódio puro, seguido pelo filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (20% g sorbitol/g caseinato de sódio). Os valores de E aumentaram de cerca de 108 kJ mol^{-1} para 202 kJ mol^{-1} para o filme de CS, enquanto que o filme contendo 50% de sorbitol (g sorbitol/g de caseinato de sódio) foi o que apresentou uma menor variação de E em relação à fração de perda de massa (α), ΔE de 32 kJ mol^{-1} .

Um fato interessante a ser notado na Figura 32 é o aumento significativo dos valores de energia de ativação aparente (E) para a degradação térmica a frações de perda de massa superior a 0,4. Aparentemente, a presença de estruturas termicamente mais estável acima de um α igual a 0,4 foi devida a formação de ligações químicas cruzadas (*crosslinking*), como têm sido descrito na literatura para poliamidas^{83,84}. Nas poliamidas, ligações químicas cruzadas durante a degradação térmica têm sido relatadas como resultado de reações entre grupos hidroxí terminais na cadeia principal e grupos carboxílicos formados pela cisão da molécula.

A variação da energia de ativação aparente (E) está relacionada a variações no mecanismo de degradação para estes sistemas. Em geral, alteração em um mecanismo de reação é um reflexo da existência de múltiplas e competitivas etapas na degradação do polímero⁷⁵. Para todos os sistemas aqui estudados os valores de E estiveram dentro do intervalo de 100-200 kJ mol⁻¹ até uma fração de perda de massa $\alpha = 0,6$. Considerando que a cisão de ligações químicas fracas está associada com valores de E menores do que 100 kJ mol⁻¹, os resultados apresentados sugerem que o processo de degradação térmica ocorreu via cisão randômica de ligações químicas fortes na cadeia protéica, e que houve uma alteração no mecanismo de degradação com a fração de perda de massa.

Materiais poliméricos sintéticos constituem a principal matéria prima para o setor de embalagens de alimentos, sendo os polímeros semicristalinos como polietileno de baixa densidade (LDPE), polietileno de alta densidade (HDPE), polipropileno (PP) e polietileno teraftalato (PET) os principais representantes desta classe, tanto em quantidade como em valores monetários despendidos. A Tabela 10 apresenta os valores de energia de ativação aparente (E) para a reação de degradação térmica de alguns polímeros utilizados como embalagem de alimentos e também biopolímeros com potencial aplicação em embalagem de alimentos.

Valores mais altos de energia de ativação aparente para a reação de degradação térmica foram observados para os polímeros sintéticos em relação aos biopolímeros como a celulose e xantana. Para os sistemas avaliados no presente estudo os valores de E estiveram entre 125-181 kJ mol⁻¹. Estes valores são da mesma magnitude daqueles encontrados para LDPE e HDPE, o que sugere que os filmes de caseinato de sódio com ou sem a adição de

plastificante (sorbitol) em termos de energia de ativação aparente para a reação de degradação térmica são comparáveis a estes polímeros sintéticos.

Tabela 10 – Energia de ativação aparente de vários polímeros sintéticos e naturais.

Polímero	E (kJ mol⁻¹)	Atmosfera	Método	Referência
Celulose	140	Nitrogênio	Friedman	11
Polipropileno	279	Ar	Freeman-Carroll	84
	220	Hélio	Isotérmico	
Polietileno	268	Hélio	Isotérmico	85
LDPE	147	Nitrogênio	Kissinger	85
HDPE	170	Nitrogênio	Kissinger	85
PET	207	Argônio	Chang	85
Xantana	131	Nitrogênio	Ozawa	86

O mecanismo de degradação térmica foi analisado por espectroscopia de infravermelho considerando os produtos gasosos e os resíduos sólidos relacionados com a reação de degradação do sistema caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4), já que todos os sistemas aqui estudados apresentam os mesmos componentes.

A Figura 33 mostra os espectros de FTIR do resíduo sólido para o filme de caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4) a diferentes temperaturas de degradação. As temperaturas para análise de FTIR foram definidas considerando-se as curvas de TGA e o estágio de degradação principal do filme CS/S (1/0,4), conforme apresentado na Figura 31.

Na temperatura ambiente, bandas de absorção relacionadas com estiramento C=O a 1655 cm⁻¹ (amida I), deformação angular N-H a 1550 cm⁻¹ (amida II) e deformação C-H a cerca de 1450 cm⁻¹ são observadas no filme CS/S (1/0,4). A banda próxima de 1100 cm⁻¹ é aparentemente formada pela contribuição de grupos diferentes tais como deformação angular fora do plano de C-H (de estruturas aromáticas) e PO₂⁻ ou estiramentos P-OH de grupos éster fosfato, os quais estão presentes em quantidade significativa no caseinato de sódio e outras proteínas, especificamente ligados a resíduos de serina. A banda próxima de 1100 cm⁻¹ inclui também a absorção relacionada ao suporte de SiO₂ utilizada para a análise

de FTIR. O suporte de SiO₂ também apresenta outra banda específica de absorção a 612 cm⁻¹, as quais, evidentemente, foram desconsideradas na análises dos espectros de FTIR.

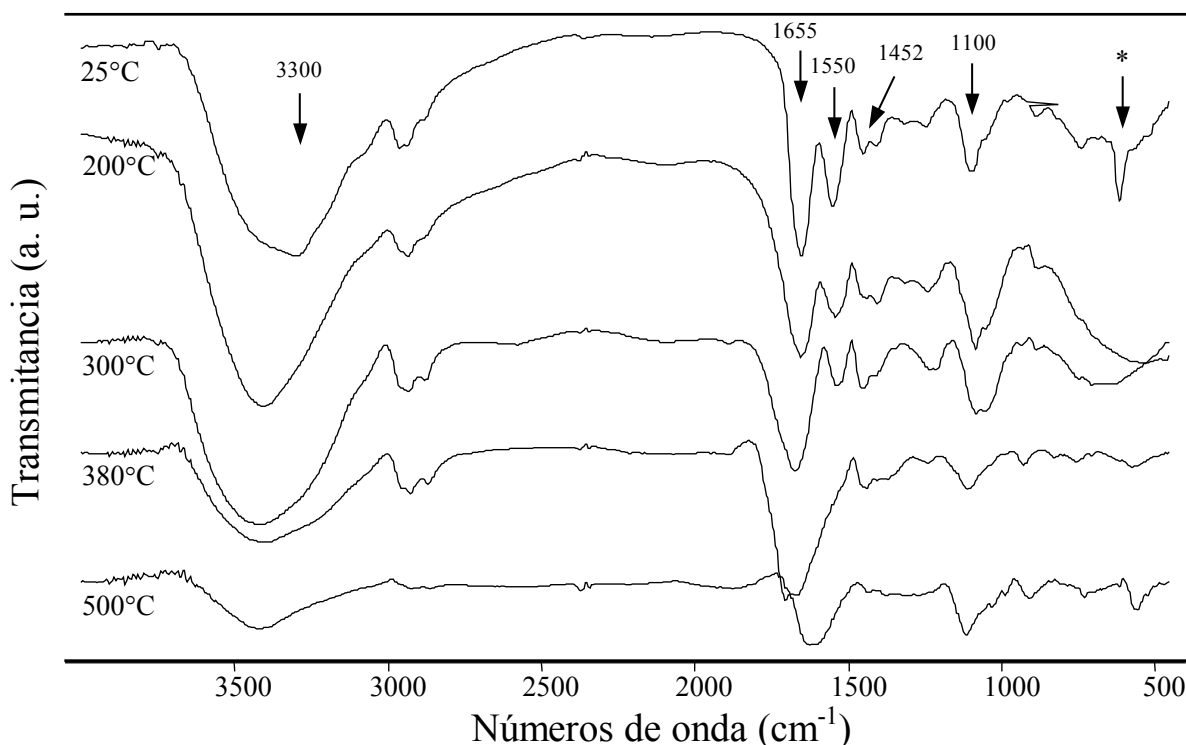


Figura 33 – Espectro FTIR do resíduo sólido do filme caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4).

A banda larga de absorção observada em um intervalo de números de onda de 3600-3000 cm⁻¹ é atribuída a grupos O-H e N-H livres e ligados. A presença de grupos O-H e N-H no caseinato de sódio, O-H no sorbitol e O-H na água adsorvida é certamente capaz de formar ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares com grupos C=O da proteína (cadeia peptídica ou resíduos laterais). A temperatura ambiente também são notados estiramentos C-H (CH₂ e CH₃) no intervalo de 3000-2800 cm⁻¹.

A 200°C foi observado, praticamente, o mesmo espectro FTIR. Algumas alterações ocorreram com a banda relacionada a grupos O-H e N-H no intervalo de números de onda de 3600-3000 cm⁻¹, onde surgiu uma banda a 3405 cm⁻¹. Aparentemente, com o aumento da temperatura, grupos O-H e N-H mais livres estavam presentes, o que faz sentido se

considerarmos que a água adsorvida foi eliminada, diminuindo assim as ligações de hidrogênio na proteína. As bandas de absorção a 3420 e 1640 cm^{-1} relacionadas com a evaporação de água a 150°C e 200°C nos espectros de FTIR dos produtos gasosos (Figura 33, discutida abaixo) confirma as considerações acima.

A 300°C, a banda a 1550 cm^{-1} (deformação angular de N-H) diminuiu sua intensidade quando comparada com a banda relacionada ao estiramento C=O a 1655 cm^{-1} . A diminuição da intensidade da banda associada ao grupo N-H vai de encontro com a formação de NH_3 gasoso observada a 260°C (Figura 34). Ao mesmo tempo, o fato de que ambas as bandas aparecem em números de onda maiores sugerem a existência de algum efeito conformacional na molécula protéica, o qual seria esperado com o desaparecimento de ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares. Este efeito foi mais acentuado a 380°C onde a banda a 1550 cm^{-1} desapareceu e a banda a 1655 cm^{-1} deslocou-se para 1706 cm^{-1} .

Até 380°C as bandas de absorção associadas com estiramento C-H no intervalo de 3000-2800 cm^{-1} , deformação C-H a 1450 cm^{-1} e banda próxima de 1100 cm^{-1} permanecem no espectro, sugerindo que o mecanismo de reação de degradação térmica inclui primeiro a cisão de ligações mais fracas do tipo C-N, C(O)-NH, C(O)-NH₂ e -NH₂ os quais estão presentes em vários resíduos laterais de aminoácidos da molécula de caseinato de sódio. Esta sugestão está de acordo com o comportamento observado para os espectros dos produtos gasosos mostrados na Figura 34. A 500°C praticamente nenhum resíduo sólido é mais observado, devido à quebra de ligações mais estáveis.

Os espectros para os produtos gasosos liberados a partir da reação de degradação térmica do filme de caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4) são mostrados na Figura 34. A 150°C-200°C, como esperado, a perda de água livre e ligada é evidente considerando as bandas de absorção a 3420 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} . A banda a 1640 cm^{-1} pode ser atribuída a água ligada como descrito, na literatura, para outros sistemas^{87,88}.

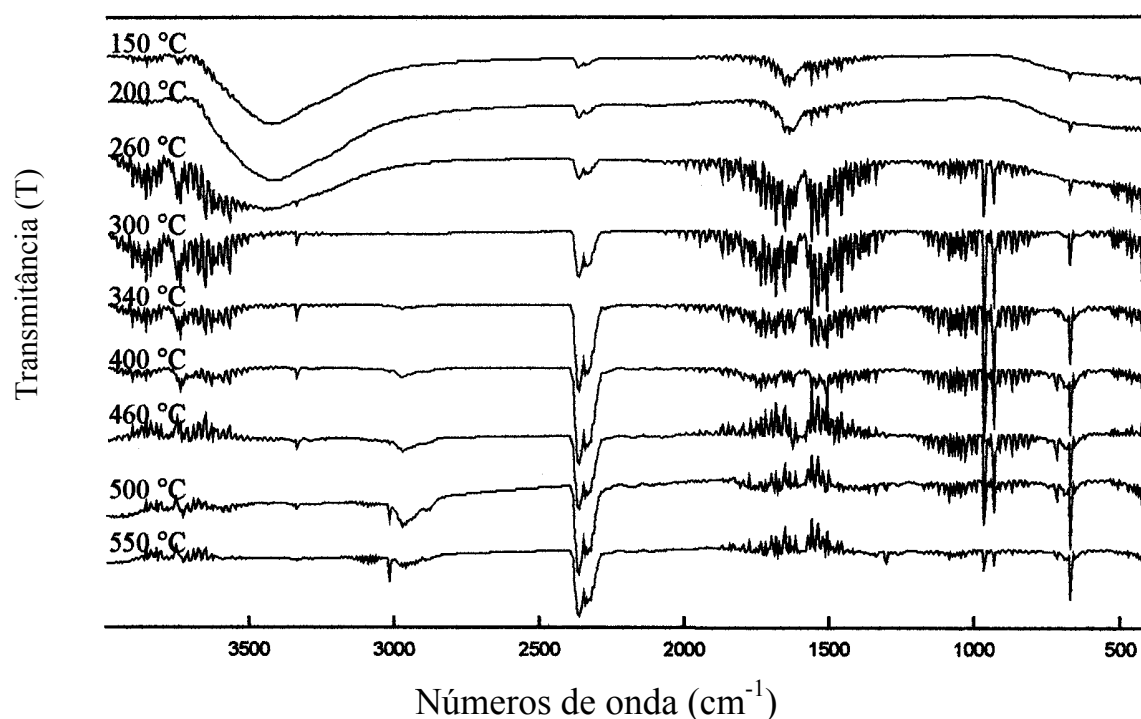


Figura 34 – Espectro FTIR dos produtos gasosos da degradação térmica de filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (40% g sorbitol/g caseinato de sódio).

A partir de 260°C, a formação de NH₃ torna-se evidente devido às bandas próximas de 930, 970 e 3335 cm⁻¹, correspondentes a vibração N-H, as quais aparecem até 500°C. A partir de 300°C, duas outras bandas de absorção estão evidentes. Estas estão relacionadas ao CO₂ (2370 e 2340 cm⁻¹) e C-H a 670 cm⁻¹. A formação de CO₂ está associada à degradação dos aminoácidos os quais representam a unidade monomérica das proteínas. A banda a 670 cm⁻¹ ocorre, em geral, em sistemas com anéis aromáticos (deformação angular) e alcenos (deformação axial). Para o sistema CS/S (1/0,4) é de se esperar que ambas as estruturas ocorressem como produtos do processo de degradação térmica. Na Figura 34 pode-se também observar bandas relacionadas ao estiramento CH no intervalo de número de ondas de 3050-2800 cm⁻¹ a temperaturas acima de 400°C, sugerindo que a cisão da cadeia polipeptídica principal de fato ocorreu.

3.11 Permeabilidade ao Oxigênio

O transporte de gases pode ocorrer por dois mecanismos: difusão capilar e difusão ativada. A difusão capilar predomina em materiais porosos ou que possuam imperfeições. A difusão ativada envolve a solubilização do permeante no filme, a difusão através do filme e finalmente a passagem para o lado oposto do filme. Na ausência de imperfeições, a permeação gasosa através do filme é provável que ocorra por difusão ativada. Se um gás é insolúvel e ainda assim penetra no filme, o mecanismo dominante será o fluxo capilar¹¹.

A estrutura química desempenha um papel importante nas propriedades de barreira de filmes biopoliméricos. Por exemplo, polímeros polares, como proteínas e polissacarídeos, exibem um alto grau de ligações de hidrogênio, resultando em valores baixos de permeabilidade a gases em baixos valores de umidade relativa de água (URE). Infelizmente, a natureza química que leva a um bom desempenho como barreira a gases resulta em uma baixa propriedades de barreira ao vapor de água⁸.

De acordo com McHugh e Krochta⁸ existe uma relação exponencial entre a permeabilidade ao oxigênio e as condições de umidade relativa de execução da análise e o efeito plastificante e/ou de intumescimento provocado pela água em polímeros hidrofílicos (polares), tais como proteínas, resultando num aumento dos valores de permeabilidade. Rico-Pena e Torres⁸⁹ ao examinarem os efeitos da umidade relativa na taxa de permeabilidade ao oxigênio observaram que somente a valores acima de 57% de URE houve um aumento exponencial na taxa de permeabilidade.

O controle da concentração do oxigênio em volta de um alimento é uma maneira de estender sua vida-de-prateleira. O oxigênio está envolvido em muitas reações de degradação em alimentos, tais como, oxidação de óleos e gorduras, crescimento de microrganismos, escurecimento enzimático, perda de vitaminas, etc.

As propriedades de barreira ao oxigênio de diversos filmes biopoliméricos e sintéticos são comparadas na Tabela 11. No entanto, deve-se analisar com precaução os dados apresentados devido a variações experimentais de temperatura e umidade relativa do ar.

Tabela 11 – Propriedades de barreira ao oxigênio de vários filmes biopoliméricos e sintéticos.

Filme	Espessura (mm)	Condições	Permeabilidade $\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{d.kPa}$	Referência
Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4)	0,1	23°C; 75%URE	47,1	Presente estudo
Colágeno		23°C; 0%URE	1,2	11
Colágeno		23°C; 63%URE	23,3	11
Colágeno		23°C; 93%URE	890	11
Zeína/glicerol (4,9/1)	0,10-0,31	30°C; 0%URE	13,0-44,9	46
Proteína do soro/sorbitol (1,5/1)	0,118	23°C; 75%URE	144,92	8
Proteína do soro/sorbitol (1/1)	0,018	23°C; 40%URE	2,35	8
Metilcelulose/PEG (9/1)	0,04-0,07	30°C; 0%URE	149-226	46
Hidroxipropilcelulose/PEG (9/1)	0,05	30°C; 0%URE	308	46
Polietileno de baixa densidade (LDPE)		23°C; 50%URE	1870	11
Polietileno de alta densidade (HDPE)		23°C; 50%URE	427	11
Celofane		23°C; 95%URE	252	11
Etilenovinilalcol (EVOH)		23°C; 95%URE	12	11

O valor médio de duas determinações da taxa de permeabilidade ao oxigênio a 23°C, a 75%UR e 1 atm de gradiente de pressão parcial de gás permeante, foi de $47,72 \text{ cm}^3 \text{ (CNTP)}/(\text{m}^2 \cdot \text{dia})$, o intervalo de variação de $43,47\text{-}51,97 \text{ cm}^3 \text{ (CNTP)}/(\text{m}^2 \cdot \text{dia})$ e coeficiente de variação de 12%.

Ao se comparar os valores da Tabela 11, percebe-se que os filmes produzidos à base de proteínas são os que apresentam os menores valores de permeabilidade ao oxigênio. Estes valores são menores do que filmes clássicos utilizados em embalagens de alimentos, como o celofane, polietileno de alta e de baixa densidade. As micrografias eletrônicas de

varreduras (seção 3.9) já apresentavam indicativos de que a permeabilidade a gases seria baixa, devido ao caracter denso e compacto da matriz polimérica.

3.12 Permeabilidade ao Vapor de Água

A natureza hidrofílica das proteínas torna os filmes protéicos uma barreira mínima à umidade, soma-se a isto a necessidade de incorporação de plastificantes, compostos que possuem, também, natureza hidrofílica. No presente estudo o plastificante incorporado à matriz polimérica foi o sorbitol, polialcool que possui seis grupos hidroxilas em sua molécula.

O resultado da taxa de permeabilidade ao vapor de água do filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (1/0,4) está apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 – Taxa de permeabilidade ao vapor de água a 23°C e 75%URE – método gravimétrico.

Filme	Média	Intervalo de variação	Coefficiente de variação
Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4)	276,2 (g/m ² .dia)	229,7 – 298,5	10,4%
Caseinato de sódio/sorbitol (1/0,4)	13,11 (g.mm/m ² .dia.kPa)	10,90 – 14,17	10,4%

Tanto a análise de permeabilidade ao oxigênio como de vapor de água só puderam ser realizadas em uma formulação do presente estudo, ou seja, na formulação em que o filme é plastificado com 40% de sorbitol em relação ao peso do caseinato de sódio. As análises foram realizadas nas dependências do CETEA (Centro de Tecnologia de Embalagem) do ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), em Campinas, estado de São Paulo, não sendo possível analisar todas as formulações. Portanto ficou limitada nossa discussão em relação ao efeito do plastificante nas propriedades de barreira, efeito da espessura do filme bem como o efeito da umidade relativa do ar. No entanto, foi possível traçar um paralelo entre o resultado obtido no presente estudo e os resultados pesquisados na literatura.

A Tabela 13 apresenta valores de permeabilidade ao vapor de água de diversos filmes protéicos, de polissacarídeos e alguns filmes de polímeros sintéticos. As propriedades dos filmes de caseinato de sódio, objeto do presente estudo, são comparáveis a outros filmes biopoliméricos.

Em geral os filmes produzidos a base de polímeros hidrofílicos são barreiras pobres ao vapor de água, e o filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (CS/S – 1/0,4) não foge a esta regra. No entanto, deve-se comparar os dados com uma certa restrição, tendo em vista as condições de temperatura e de umidade relativa do ar do ensaio, já que os dados encontrados na literatura são muitos diversos em relação a estes pontos.

De acordo com a Tabela 13, os valores da taxa de permeabilidade ao vapor de água mostram que o plastificante pode incrementar ou retardar a permeação do vapor de água, dependendo de sua concentração, e que o tipo de plastificante também exerce influência na taxa de permeação. Percebe-se que a umidade relativa do ar na hora do ensaio possui influência na permeabilidade ao vapor de água, sendo que quanto maior a umidade relativa do ar, maior os valores de permeação ao vapor de água. Dados da literatura^{8,89}, apontam que a taxa de permeação ao vapor de água possui uma relação exponencial com a umidade relativa do ar, por ocasião da medida experimental.

O que fica claro da análise das Tabelas 12 e 13 é que o filme em estudo apresentou uma permeabilidade ao vapor de água menor do que o filme puro de caseinato de sódio e de caseinato de cálcio, apesar das condições dos testes serem ligeiramente diferentes. Apresentou ainda um valor muito semelhante ao filme de caseinato de sódio plastificado com glicerol, apesar também de condições de testes diferentes.

Percebe-se que os filmes de proteína do soro do leite apresentaram um valor mais elevado para a permeabilidade ao vapor de água. Filmes contendo gorduras ou ceras, caso do filme de HPMC/ácido esteárico ou do filme de cera de abelha, apresentaram um valor bem mais reduzido para a permeabilidade ao vapor de água do que o filme do presente estudo. Além disso, os valores de barreira ao vapor de água para os filmes de polímeros sintéticos (LDPE e HDPE) foram, também, bem menores do que para os filmes de biopolímeros (proteínas e polissacarídeos).

Tabela 13 – Valores de permeabilidade ao vapor de água de diversos filmes biopoliméricos e sintéticos.

Filme	Condições	Espessura (mm)	Permeabilidade (g.mmm/m ² .dia.kPa)	Referência
Zeína/glicerol (4,9/1)	21°C;85/0%URE	0,12-0,33	7,69 – 11,49	46
Caseinato de sódio	25°C;81,2/0%URE	0,083	36,72	25
Caseinato de cálcio	25°C;85/0%URE	0,083	28,1	25
Caseinato de sódio/glicerol (0,89/1)	20°C;45-0%URE	0,104	11,34	23
Caseinato de sódio/PEG (0,81/1)	20°C;45-0%URE	0,071	22,46	23
Proteína do soro do leite/glicerina (1,6/1)	25°C;65-0%URE	0,121	119,8	11
Proteína do soro do leite/Sorbitol (1,6/1)	25°C;75-0%URE	0,129	62,0	11
Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	27°C;85-0%URE	0,019	9,12	11
HPMC/Ac. Esteárico (0,8/1)	27°C;85-0%URE	0,019	0,026	11
Cêra de abelha	25°C;100-0%URE	0,04-0,05	0,0502	11
LDPE	38°C;90-0%URE		0,079	90
HDPE	38°C;90-0%URE		0,020	90
Celofane	38°C;90-0%URE		7,27	90

Assim é necessário um maior volume de pesquisas em filmes a base de proteínas e polissacarídeos de modo a reduzir a sua hidrofiliabilidade e consequentemente a permeabilidade ao vapor de água, no intuito de promover, incentivar e efetivamente aplicar estes filmes em embalagens de alimentos.

3.13 Aplicação dos filmes CS/S

Proteínas do leite são excelentes materiais para barreiras gasosas, especialmente em baixa umidade, e podem ser utilizadas como fonte de matéria-prima para filmes que se comportem como barreiras gasosas na regulação de respiração e oxidação [11]. No entanto, não se tem conhecimento na literatura da aplicação direta de filmes protéicos em frutas e de

suas conseqüências. Assim, foram aplicados filmes de caseinato de sódio/sorbitol em banana-prata no intuito de acompanhar possíveis alterações no processo de amadurecimento da fruta, já que este é essencialmente promovido por trocas gasosas (O_2 , CO_2 e C_2H_4) entre o meio e a fruta, especialmente nas climatéricas.

Após sete dias da aplicação as amostras com filmes apresentavam uma forte coloração amarelada, enquanto as amostras controle (sem filme) continuavam com coloração verde. Para comprovar o amadurecimento da fruta, e não somente alteração na coloração, foram realizadas análises de teor de amido, açúcares redutores em glicose e açúcares não redutores em sacarose e pH. Os resultados experimentais utilizando filmes CS/S são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Parâmetros bioquímicos de amadurecimento de banana-prata.

FRUTA (banana-prata)	PH	Amido (%)	Açúcares redutores (%)	Açúcares não redutores (%)
Sem filme de CS/S	5,43	27,8	< 1	< 1
Com filme de CS/S	4,48	3,4	18,85	2,3

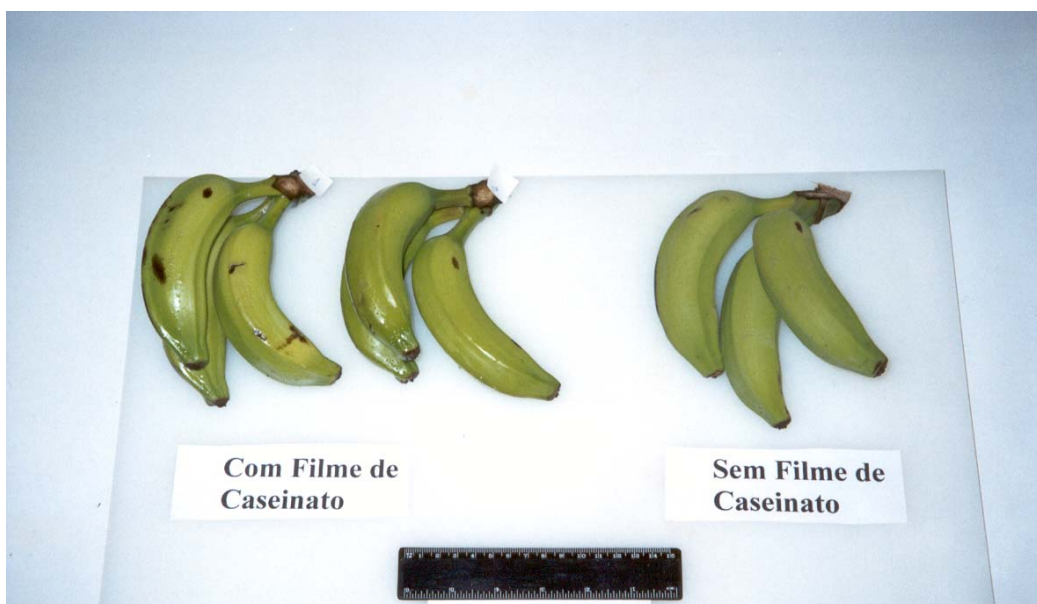
A diferença na coloração das frutas correspondeu também a uma diferença na composição centesimal nos parâmetros de amadurecimento. Segundo Belitz e Grosch³ ocorrem certas transformações químicas em frutas climatéricas (banana) durante o processo de amadurecimento, em especial um acentuado decréscimo na concentração de amido, paralelamente a um incremento de glicose, frutose e sacarose, fato este observado no presente estudo.

A aceleração no processo de amadurecimento da fruta foi devido a uma barreira formada pelo filme de caseinato de sódio/sorbitol que impediu trocas gasosas entre a fruta e o meio ambiente. Este fato sugere uma permeabilidade seletiva (O_2 , CO_2 e C_2H_4) do filme de caseinato de sódio/sorbitol a gases que auxiliam no processo de amadurecimento de

frutos climatéricos (banana). O acompanhamento do processo de amadurecimento é mostrado na Figura 35.



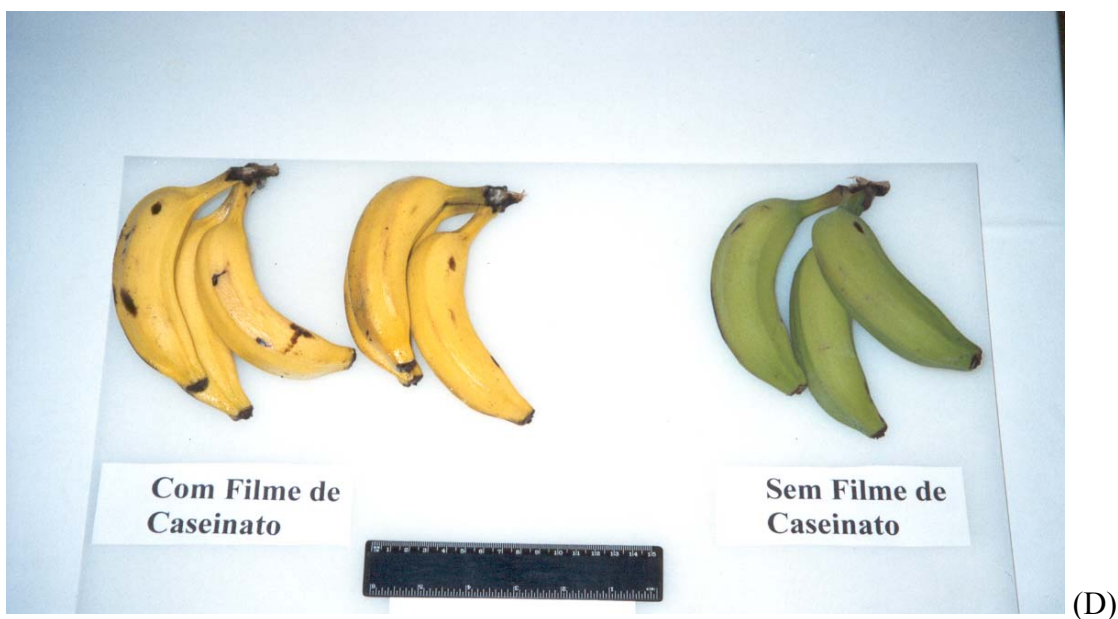
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 35 – Fotografias das frutas (bananas) recobertas ou não com filme de caseinato de sódio (1/0,4). (A) primeiro dia, antes do recobrimento com o filme; (B) 72 horas após o recobrimento com o filme de caseinato de sódio; (C) 120 horas após o recobrimento com o filme de caseinato de sódio; (D) 192 horas após o recobrimento com o filme de caseinato de sódio.

CONCLUSÕES

As propriedades reológicas das soluções formadoras de filmes, avaliadas em termos de concentração, temperatura e conteúdo de plastificante, mostrou um comportamento tipicamente newtoniano. O efeito da temperatura na viscosidade foi descrito pela equação de Arrhenius. A viscosidade das soluções aumentou com a concentração, seguindo o modelo da lei das potências. A presença do plastificante nas soluções de caseinato de sódio reduziu o volume específico parcial, levando o caseinato de sódio a uma estrutura mais ordenada, confirmada por espectroscopia de dicroísmo circular. As propriedades das soluções formadoras de filmes devem ser consideradas já que elas refletem o comportamento do filme.

O estudo das propriedades mecânicas dos filmes de caseinato de sódio, demonstrou que o plastificante utilizado diminui o módulo de elasticidade e a tensão máxima, enquanto aumentou a deformação na ruptura. Um efeito plastificante semelhante foi observado quando se considerou a presença de umidade nos filmes. A adição de sorbitol, como plastificante, demonstrou um efeito depressor na temperatura de transição vítrea.

A presença do sorbitol, como plastificante, não alterou a morfologia do filme, analisada por microscopia eletrônica de varredura.

A estabilidade térmica dos filmes de caseinato foi avaliada, sendo que o filme de caseinato de sódio demonstrou o maior valor para a temperatura de degradação máxima, sendo que os filmes plastificados com sorbitol apresentaram uma diminuição da temperatura de degradação máxima a medida em que aumenta o conteúdo de sorbitol presente no filme de caseinato de sódio. O filme que apresentou uma maior variação na energia de ativação aparente em relação à fração de perda de massa (α) foi o filme de caseinato de sódio puro, seguido pelo filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (20% g sorbitol/g caseinato de sódio). O espectro de FTIR para o produto gasoso mostra que o CO_2 e NH_3 aparecem, aproximadamente, na mesma temperatura (300°C), sugerindo que o mecanismo de reação inclui a cisão de ligações C-N, C(O)-NH, C(O)-NH₂, -NH₂ e C(O)-OH. Esta conclusão é suportada pelos valores de energia de ativação, que refletem

um processo de cisão randômica da cadeia polipeptídica, provavelmente com múltiplos e competitivos estágios na degradação térmica do filme.

O valor de permeabilidade ao vapor de água do filme de caseinato de sódio plastificado com sorbitol (40% p/p) é semelhante a filmes protéicos descritos na literatura, enquanto o valor da permeabilidade ao CO₂ é comparável aos valores, também descritos na literatura, de filmes sintéticos, como LDPE e HDPE.

A aplicação de filmes em bananas demonstrou uma aceleração do processo de amadurecimento, provavelmente, devido a uma permeabilidade seletiva dos gases responsáveis pela troca gasosa durante o processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J-A.; Delporte, B.; Voilley, A.. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of membrane Science*, v. 180, p.47-55, 2000.
- [2] Yang, L.; Paulson, A.T. Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films. *Food Research Internacional*, v.33, p.563-570, 2000.
- [3] Belitz, H.D.; Grosch, W.. *Química de los Alimentos*, 2ª ed., Zaragoza, Espanha, Editorial Acríbia S.A. 1992.
- [4] Ferry, J.D. *Viscoelastic Properties of Polymers*, 3ª ed., New York, John Wiley and Sons, Inc. 1980.
- [5] Billmeyer, F.W.. *Textbook of Polymer Science*, 3ª ed., New York, John Wiley and Sons, Inc. 1994.
- [6] Banker. G.S.; Gore, A.Y.; Swarbrick, J. Water vapor transmission properties of free polymer films . *Journal of pharmaceutical sciences*, v.18, p.457-466, 1966]
- [7] Mahmoud e Savello, 1992 – Mahmaoud, R.; Savello, P.A. Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. *Journal Dairy Science*, 75, p.942-946. 1992)
- [8] McHugh, T.H.; Krochta, J.M. Sorbitol- vs. glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, n.4, p.841-845. 1994)
- [9] Kester, J.J.; Fennema, O.R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v.40, n.12, p.47-59. 1986)

- [10] Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J-A.; Voilley, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings:a review, v.38, n.4, p.299-313. 1998)
- [11] Krochta, J.M.; Baldiwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O.. Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. Lancaster, Pennsylvania, USA, Technomic Publishing Co.. 1994.
- [12] Gennadios A.; Weller, C.L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. Food Technology, v.44, n.10, p.63-69. 1990)
- [13] Voet, D.; Voet, J. Pratt, C.W. Fundamentos de Bioquímica. Ed. Artmed. São Paulo. 931p. 2000.
- [14] Creighton, T.E. Proteins, Structures and Molecular Properties. Ed. W. H. Freeman and Company. New York, USA. 507 p. 1996.
- [15] Lehninger, A.L. Biochemistry. Worth Publishers. 2nd ed. 1994.
- [16] Sgarbieri, V.C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo, Livraria Varela, 1996. 517p.
- [17] McHugh, T.H.; Aujard, J-F.; Krochta, J.M.. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. Journal of Food Science, v.59, n.2, p.416-419,423. 1994]
- [18] Kalichevsky, M.T.; Blanchard, J.M.V.; Tokarczyk, P.F.. Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate. Internacional Journal Food Science and Technology, 1993, v.28, p.139-151]
- [19] Tager, A. Physical Chemistry of Polymers. MIR Publishers, Moscow.558p. 1972.

[20] van Hold, K.E.; Johnson, W.C.; Ho, P.S. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall. New Jersey, USA. 657p. 1998.

[21] Tung, M.A. – Rheology of protein dispersions. Journal of food texture studies, v.9, p.03-31. 1978)

[22] Konstance, R.P.; Strange, E.D.. Solubility and viscous properties of casein and caseinates. Journal of Food Science, v.56, n.2, p.556-559, 1991.

[23] Siew, D.C.W.; Heilmann, C.; Easteal, A.J.; Cooney, R.P.. Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/polyethylene glycol edible coating systems. Journal of Agricultural Food Chemistry, v.47, p.3432-3440, 1999

[24] Arvanitoyannis, I.; Psomiadou, E., Nakayama, A. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1. Carbohydrate Polymers, v.31, p.179-192, 1996.

[25] Avena-Bustillos, R.J.; Krochta. J.M.. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking ligand and lipid content. Journal of Food Science, v.58, n.4, p.904-907, 1993.

[26] Garcia Rodenas, C.L.; Cuq, J.L.; Aymard, C.H.. Comparison of in vitro proteolysis of casein and gluten as edible films or as untreated proteins. Food Chemistry, v. 51, p.275-280, 1994

[27] Ward, I.M.; Hardley, D.W. An introduction to the mechanical properties of solid polymers. Ed. John Wiley & Sons, Great Britain, 1998)

[28] Mauer, L.J.; Smith, D.E.; Labuza, T.P.. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films. Internacional Dairy journal, v. 10 (2000) p.353-358.).

- [29] Arvanitoyannis, I. & Biliaderis, C.G. Physical properties of polyol-plasticized edible blens made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate polymers*, v.38, p.47-58, 1999]
- [30] Di Gioia, L.; Cuq, B.; Guilbert, S. Effect of hydrophilic plasticizers on thermomechanical properties of corn gluten meal. *Cereal Chemistry*, v.75 (4), p.514-519. 1998].
- [31] Gontard, N.; Guilbert, S. & Cuq, J-L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of food science*, v.58, n.1, p.206-211, 1993];
- [32] Kalichevsky, M.T.; Blanshard. J.M.V. A study of the effect of water on the glass transition of 1:1 mixtures of amylopectin, casein and gluten using DSC and DMTA. *Carbohydrate Polymers*, v. 19, p.271-278, 1992];
- [33] Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of food science*, v.57, n.1, p.190-195,1999
- [34] Handa, A.; Gennadios, A.; Froning, G.W.; Kuroda, N.; Hanna, M.A.. Tensile, solubility, and electrophoretic properties of egg white films as affected by surface sulfhydryl groups. *Journal of Food science*, v.64, n.1, p.82-85, 1999]
- [35] Galiotta, G.; di Gioia, L.; Guilbert, S.; Cuq, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, v.81, p.3123-3130, 1998]
- [36] Cherian G., Gennadios, A., Weller, C. & Chinachoti, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: Effect of sucrose, glycerin, and sorbitol *Cereal Chemistry*, v.72, n.1, p.1-6, 1995.

- [37] Gontard, N., Ring, S. Edible wheat gluten film: Influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.44, p.3474-3478];
- [38] Slade, L.; & Levine, H. The glassy state phenomenon in food molecules. IN: *The Glassy State in Foods*. J.M. Blanshard & P.J.Lillford, ed. Nottingham Univ. Press, Loughborough, England; p.35-102, 1993
- [39] Anker, M.; Stading, M.; Hermansson. A-M.. Effects of pH on the mechanical properties, moisture contents, and glass transition temperatures of whey protein films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.47, p.1878-1866, 1999]
- [40] Cuq, B.; Gontard, N.; & Guilbert, S. Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: application to the biopackaging fabrication. *Polymer*, v.38, p.4071-4078, 1997]
- [41] Kalichevsky, M.T.; Blanshard, J.M.V.. A study of the effect of water on the glass transition of 1:1 mixtures of amylopectin, casein and gluten using DSC and DMTA. *Carbohydrate Polymers*, v.19, p.271-278, 1992]
- [42] Cuq, B.; Gontard, N.; Cuq, J.L.; Guilbert, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.45, p.622-626, 1997])
- [43] Kalichevsky, M.T.; Jaroszkiewicz, E.M. & Blanshard, J.M.V. Glass transition of gluten. 1: gluten and gluten-sugar mixtures. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, v.14, p.257-266, 1992].
- [44] Roy S.; Weller C.L.; Gennadios, A.; Zeece, M.G.; & R. F. Testin, R.F.. Physical and molecular properties of wheat gluten films cast from heated film-forming solutions. *Journal of food science*, v.64, n.1, p.57-60, 1999];

[45] Miller, K.S.; Krochta, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Trends in Food Science and Technology*, v.81, p.228-237, 1997.

[46] Park, H.J.; Chinnan, M.S.. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of food engineering*, v.25, p.497-507, 1995].

[47] Handa, A.; Gennadios, A.; Hanna, M.A.; Weller, C.L.; Kuroda, N. Physical and molecular properties of egg-white lipid films. *Journal of Food Science*, v.64, n.5, p.860-864, 1999]

[48] Pérez-Gago, M.B.; Nadaud, P.; Krochta, J.M.. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, v.64, n.6, 1999

[49] Callister Jr, W.D.. *Materials Science and Engineering, An Introduction*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc. USA, p.83-84, 821, 1997]

[50] mev de polímeros

[51] mev de polímeros

[52] ASTM D882-95a (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting),

[53] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, p.680-685. 1970.

[54] (Silva Júnior, 2001 – Silva Júnior, J.G. *Eletroforese de proteínas: Guia teórico-prático*. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, RJ. 2001)

- [55] Jahaniaval, F.; Kakuda, Y.; Abraham, V.; Marcone, M.F. Soluble protein fractions from pH and heated treated sodium caseinate: physicochemical and functional properties. *Food Research Internacional*, 33, p.637-647.
- [56] Khalil, K.E.; Ramakrishna, P.; Nanjundaswamy, A.M.; Patwardhan, M.V.. Rheological behaviour of clarified banana juice: Effect of temperature and concentration. *Journal of Food Engineering*, v.10, p.231-240, 1989
- [57] Rao, M.A.; Cooley, H.J.; Vitali, A.A.. Flow properties of concentrated fruit juices at low temperature. *Food Technology*, n.3, p.113-119. 1984
- [58] Bhattacharya, S.; Bhat, K.K.; Raghuveer, K.G.. Rheology of Bengal Gram (*Cicer arietinum*) flour suspensions. *Journal of Food Engineering*, n.17, p.83-96, 1992
- [59] Rao, M.A., Bourne, M.C.; Cooley, H.J.. Flow properties of tomato concentrates. *Journal of Texture Studies*, v.12, p.521-538, 1981
- [60] Gekko, K.; Timasheff, S.N. Mechanism of protein stabilization by glycerol preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, v.20, p.4667-4676, 1981.
- [61] Kamiyama, T.; Sadahide, Y.; Nogusa, Y.; Gekko, K.. Polyol-induced molten globule of cytochrome c: an evidence for stabilization by hydrophobic interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1434, p.44-57, 1999.
- [62] Subirade, M.; Kelly, I.; Guéguen, J.; Pézolet, M. Molecular basis of film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solutions and in films. *Internacional Journal of Biology and Macromolecules*, 23, p.241-249. 1998.

- [63] Chirife e Inglesias, 1978. Chirife, J. e Inglesias H.A. Equations for fitting water sorption isotherms os foods: Part 1 – a review. Journal of Food Technology, v.13, p.159-174. 1978.)
- [64] Coupland, J.N.; Shaw, N.B.; Monahan, F.J.; O’Riordan, E.D.; O’Sullivan, M. Modeling the effect of glicerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. Journal of Food Engineering, v.43, p. 25-30. 2000)
- [65] Gennadios, A.; Weller, C.L. Moisture adsorption by grain protein films. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers, v. 37, p.353-359. 1994)
- [66] Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J.-L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of na edible wheat glúten film. Journal of Food Science, v. 58, p.206-211. 1993)
- [67] Chinnan, M.S.; Park, H.J. Effect of plasticizer and temperature on the water vapor transmission of celulose based edible films. Journal of Food Process Engineering, v. 18, p. 417-429. 1995)
- [68] Fennema, O. Química de los alimentos, 2ª edicion, Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.54-64, 2000)
- [69] Cuq, B.; Gontard, N.; Aymard C.; Guilbert S. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. Polymer Gels nad Networks, v.5, p. 1-15. 1997)
- [70] Cruz, G.V.; Torres, J.A.; Martín-Polo, M.O. Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films. Journal of Food Engineering, v. 48, p. 91-94, 2001.

- [71] Kim, S-J.; Ustunol, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4388-4391.1999.
- [72] Lim, T-Y.; Mine, Y.; Tung, M.A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. *Journal of Food Science*, v.64, n. 4, p. 616-622. 1999.
- [73] Labuza, T.P.; Kaanane, A.; Chen, J.Y. Effects of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. *Journal of Food Science*, v. 50, p.385. 1985.).
- [74] Towns, J.K. Moisture content in proteins: its effects and measurement. *Journal of Chromatography A.*, n. 705, p.115-127. 1995)
- [75] Hatakeyama, T.; Quinn, F.X.. *Thermal Analysis – Fundamentals and Applications to Polymer Science*. Chichester, England, John Wiley and Sons, Inc. 1994
- [76] Cherian, G.; Gennadios, A.; Weller, C; Chinachoti, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol. *Cereal Chemistry*, 72, p.1-6. 1995.
- [77] Debeaufort, F.; Voilley, A. Methylcellulose based edible films and coatings: 2.Mechanical and thermal properties as a function of plasticizers content. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, p.685-689, 1997.)
- [78] Kalab, M. Food Structure and milk products. In: Huy, Y.H. *Encyclopedia of food science and technology* (p.1170-1196). New York, Wiley Interscience, 1993.

- [79] Barreto, P.L.M.; Pires, A.T.N.; Soldi, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation Stability*, 79, p.147-152. 2003.
- [80] Kaminska, A. Sionkowska, A. *Polymer Degradation and Stability*, 65, p.87-90. 1999.
- [81] Ozawa, T. *Journal Thermal Analysis*, v.9, n.3, p.369-373. 1976.
- [82] Ozawa, T. *Journal Thermal Analysis*, v.7, n.3, p.601-617. 1975.
- [83] Peebles, L.H.; Huffman, M.H. *Journal Polymr Science. A-1*, 9, p.1807. 1971.
- [84] Jandura, P.; Riedl, B.; Kokta, B.V. *Polymer Degradation Stability*, 70, p.387-394. 2000.
- [85] Brown, D.J. The glassy state in packaging. In: *The Glassy State in Foods*. Nottingham University Press. p. 453-468. 1993
- [86] Villetti, M.A.; Crespo, J.S.; Soldi, M.S.; Pires, A.T.N.; Borsali, R.; Soldi, V. Thermal degradation of natural polymers. *Journal Thermal Analysis*, v.67, p.295-303. 2002.
- [87] Berwig, E.; Severgnini, V.L.S.; Soldi, M.S.; Bianco, G.; Pinheiro, E.A.; Pires, A.T.N.; Soldi, V. *Polymer Degradation and Stability*. Em impressão.
- [88] Phan, T.T.M.; Denicola Jr.; A.J.; Schadler, L.S. *Journal Applied Polymer Science*. V.68, n.9, p.1451-1472. 1998.
- [89] Rico-Pena, D.C.; Torres, J.A. Oxygen transmission rates of an edible methylcellulose-palmitic acid film. *Journal Food Process Engineering*. V.13, p.125-133. 1990.

[90] Smith, S.A, Polyethylene, Low Density,” The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology, M. Bakker, ed, New York: John Wiley & Sons, p.514-523. 1986.